

**Entgiftung lipophiler Xenobiotika -  
die Cystein-S -Konjugat-spezifische  
N -Acetyl-S -Transferase:  
Ein repräsentatives Enzym des Mercaptursäureweges**

Dem Fachbereich Chemie  
der Technischen Universität Darmstadt  
zur  
Erlangung des akademischen Grades  
eines Doktor-Ingenieurs  
vorgelegte Dissertation von

Diplom-Ingenieur Torsten Kraus  
aus Heringen/Werra

Berichterstatter:  
Mitberichterstatter:  
Tag der Einreichung:  
Tag der mündlichen Prüfung:

Prof. Dr. H. G. Gassen  
Prof. Dr. N. A. Dencher  
26. November 1999  
07. Februar 2000

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von März 1995 bis November 1999 am Institut für Biochemie der Technischen Universität Darmstadt unter Leitung von Prof. Dr. H. G. Gassen angefertigt.

Herrn Prof. Dr. H. G. Gassen danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, sein stetes Interesse und seine Diskussionsbereitschaft.

Besonderer Dank gilt Dr. Sabine Wolf. Ihre kompetente und engagierte Betreuung hat wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Durch ihre zahlreichen und fachlichen Ratschläge wurde ich in die Geheimnisse der Proteinchemie eingeweiht. Danke auch für die endlose Geduld und den unvergesslichen „Biochemie-Seminaren“ in Frankreich.

Dank gilt auch Katja Lützenkirchen und Daniel Milani. Sie haben diese Arbeit im Rahmen ihrer Diplomarbeiten unterstützt.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Martina Jäger. Sie stellte häufig meine Geduld auf die Probe und lehrte mich, immer die Ruhe zu bewahren. Insbesondere dann, wenn ich wieder einmal mein Labormaterial bei ihr zusammen suchen durfte. Danke auch für die außerordentlich angenehme Arbeitsatmosphäre und den vielen fachlichen, wie auch persönlichen Gesprächen.

Der „Alten Garde“ und der vielen Mitarbeiter aus den Laboren 608 und 620 sei ebenfalls gedankt. Namentlich möchte ich mich bei Peter Weber und Achim Aigner für die vielen anregenden Gespräche bedanken.

Danke auch an Silke Schepelmann. Sie führte mich in die wunderbare Welt der Molekularbiologie ein. Ohne ihr Wissen und ihrer Geduld würde mir diese Welt immer noch verschlossen sein.

Frau R. Moldehn danke ich für die Aminosäureanalysen und für das ausgesprochen gute Arbeitsklima.

Herrn Dr. H. G. Neiss möchte ich für die vielen anregenden Gespräche und auch für die Einblicke in Computerhardware danken.

Ralf Pasternack zeigte stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit. Für die vielen Tips und Aufmunterungen möchte ich ihm danken.

Prof. Dr. M. W. Anders und Vinita Uttamsingh (Rochester, NY) danke ich für die Bereitstellung der Cystein-S –Konjugate.

Mein besonderer Dank gilt Susanne Schäfer. Ihre persönliche Unterstützung und ihr Interesse an meiner Arbeit sorgten in der „Endphase“ für die notwendige Motivation, auch wenn der Weg dorthin manchmal beschwerlich und weit war.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern für die große persönliche Unterstützung während meines Studiums danken. Sie ermutigten mich auf meinem Weg und ermöglichten mir so den Abschluß.

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungsverzeichnis	V
1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	2
2.1 Umweltchemikalien	2
2.2 Aufnahme von Xenobiotika	3
2.2.1 Aufnahme von Xenobiotika durch die Haut	4
2.2.2 Aufnahme durch den Magen-Darm-Kanal	5
2.2.3 Aufnahme über die Lungen	6
2.2.4 Die Verteilung der Xenobiotika im Organismus	7
2.3 Die Ausscheidung von Xenobiotika	7
2.3.1 Die Leber	7
2.3.2 Die Nieren	9
2.4 Biotransformation von Xenobiotika	12
2.5 Entgiftung lipophiler Xenobiotika	15
2.5.1 Der Mercaptursäureweg der Entgiftung	15
2.5.2 Entgiftung von halogenierten lipophilen Xenobiotika	19
2.5.3 Die Cystein-S -Konjugat-spezifische <i>N</i> -Acetyl-S -Transferase (EC 2.3.1.80)	22
2.6 Aufgabenstellung	23
3. Materialien	25
3.1 Allgemeine Laborchemikalien	25
3.2 Laborgeräte	26
3.3 Bakterienstämme	27
3.4 Plasmide und Bakteriophagen	28
3.5 Nukleotide und Oligonukleotide	28
3.6 Radiochemikalien	29
3.7 Größenstandards	29
3.8 Enzyme	29

3.9	Säulenmaterialien	30
3.10	Sonstige Materialien	30
4.	Methoden	31
4.1	Chemische Synthesen	31
4.1.1	Synthese von S -(4-Nitrobenzyl)-L-cystein	31
4.1.2	Synthese von N -Acetyl-S -(4-nitrobenzyl)-L-cystein	31
4.1.3	Synthese von N,N' -Bis-(3-D-gluconamidopropyl)-desoxycholamid („DesoxyBIGCHAP“)	31
4.2	Proteinchemische Methoden	32
4.2.1	Enzymaktivitätstests	32
4.2.1.1	Radioaktive Bestimmung der Aktivität der N -Acetyl-S -Transferase	32
4.2.1.2	Nichtradioaktive Bestimmung der Aktivität der N -Acetyl-S -Transferase	34
4.2.1.3	Bestimmung der Aktivität der Desacetylase	35
4.2.1.4	Bestimmung der Aktivität der Acetyl-CoA-Hydrolase	35
4.2.2	Proteinbestimmung	36
4.2.2.1	Absorptionsmessung bei 280 nm	36
4.2.2.2	Proteinbestimmung durch Totalhydrolyse	36
4.2.3	Konzentrierung oder Umpuffern von Proteinlösungen	37
4.2.3.1	Druckdialyse mit Amicon-Zellen	37
4.2.3.2	Konzentrierung durch Zentrifugation in Centricon Ultrakonzentratoren	37
4.2.4	Fällung von Proteinen	37
4.2.4.1	Fällung mit Trichloressigsäure	37
4.2.4.2	Fällung mit Aceton	38
4.2.5	Gelanalyse von Proteinen	38
4.2.5.1	Modifizierte SDS-Gelelektrophorese nach Neville	38
4.2.5.2	Zweidimensionale Gelelektrophorese	40
4.2.5.2.1	Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung	40
4.2.5.2.2	Zweite Dimension: SDS-Gelelektrophorese	41
4.2.6	Färbemethoden für SDS-Polyacrylamidgele	42
4.2.6.1	Silberfärbung nach Blum et al.	42
4.2.6.2	Coomassie Brilliant Blau-Färbung nach Neuhoff	43
4.2.7	Elektrotransfer von Proteinen aus SDS-Polyacrylamidgelen	43
4.2.8	Färbemethoden für Blotmembranen	45
4.2.8.1	Coomassie Brilliant Blau-Färbung von PVDF-Membranen	45
4.2.8.2	Ponceau S-Färbung von Nitrocellulosemembranen	45
4.2.8.3	Immunchemische Färbung von Nitrocellulosemembranen	45

4.2.9	Experimente zur Solubilisierung der <i>N</i> -Acetyl-S-Transferase	47
4.2.9.1	Solubilisierung mit nichtdetergenten Sulfobetainen	47
4.2.9.2	Solubilisierung mit Detergenzien	47
4.2.9.3	Solubilisierung mit Triton X-114	48
4.2.9.4	Solubilisierung mit Phospholipase C	48
4.2.10	Säulenchromatographische Methoden zur partiellen Reinigung der <i>N</i> -Acetyl-S-Transferase	49
4.2.10.1	Präparation der mikrosomalen Fraktion aus Schweinenieren	49
4.2.10.2	Solubilisierung und Polyethylenglykol-Fällung	49
4.2.10.3	FPLC-DEAE Blue Anionenaustauschchromatographie	50
4.2.10.4	FPLC-Resource Q-Anionenaustauschchromatographie	51
4.2.11	Kinetische Daten der <i>N</i> -Acetyl-S-Transferase	51
4.2.11.1	Präparation einer Enzymfraktion aus Schweinenieren	51
4.2.11.2	Messung von $K_m$ und $V_{max}$ für verschiedene Cystein-S-Konjugate	52
4.2.11.3	Temperaturstabilität der <i>N</i> -Acetyl-S-Transferase	52
4.3	Molekularbiologische Methoden	53
4.3.1	Kultivierung von <i>E.coli</i> Bakterien	53
4.3.1.1	Medien zur Kultivierung von <i>E.coli</i> Bakterien	53
4.3.1.2	Plattenkulturen	54
4.3.1.3	Flüssigkulturen	55
4.3.1.4	Dauerkulturen	55
4.3.2	Herstellung kompetenter <i>E.coli</i> -Zellen	55
4.3.3	Transformation von kompetenten <i>E.coli</i> -Zellen	56
4.3.4	Isolierung von Nukleinsäuren	56
4.3.4.1	Gewinnung von Phagenlysat	56
4.3.4.2	Isolierung von rekombinanter DNA	57
4.3.4.2.1	Plasmidschnellanalyse	57
4.3.4.2.2	DNA-Präparation mit Qiagen-Säulenchromatographie	58
4.3.4.3	Reinigung von Nukleinsäuren	60
4.3.4.3.1	Phenolextraktion	60
4.3.4.3.2	Ethanol-fällung	60
4.3.4.3.3	Elution von DNA aus Agarosegelen	61
4.3.5	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	61
4.3.6	Amplifikation von cDNA-Insertionen mit Hilfe der Polymerasenkettenreaktion (PCR)	62
4.3.7	Nicht-denaturierende Agarosegelelektrophorese	63
4.3.8	Manipulation und Analyse rekombinanter DNA	64
4.3.8.1	Sequenzspezifische Hydrolyse von DNA	64
4.3.8.2	5'-Dephosphorylierung des restringierten Vektors	64
4.3.8.3	Ligation von DNA-Fragmenten	64
4.3.8.4	Sequenzanalyse von rekombinanter DNA	65
5.	Ergebnisse	68

5.1	Chemische Synthesen	68
5.1.1	S -(4-Nitrobenzyl)-L-cystein	68
5.1.2	N -Acetyl-S -(4-nitrobenzyl)-L-cystein	68
5.1.3	N,N' -Bis-(3-D-gluconamidopropyl)-desoxycholamid („DesoxyBIGCHAP“)	68
5.2	Aktivitätstests	69
5.2.1	Bestimmung der Aktivität der N -Acetyl-S -Transferase durch einen radioaktiven Test	69
5.2.2	Bestimmung der Aktivität der Desacetylase	71
5.2.3	Bestimmung der Aktivität der Acetyl-CoA-Hydrolase	72
5.3	Solubilisierung der N -Acetyl-S -Transferase	73
5.3.1	Nichtdetergente Sulfobetaine	73
5.3.2	Solubilisierung mit verschiedenen Detergenzien	74
5.3.3	Solubilisierung mit Triton X-114	75
5.3.4	Solubilisierung mit Phospholipase C	77
5.4	Teilreinigung der N -Acetyl-S -Transferase	78
5.4.1	Präparation der mikrosomalen Fraktion aus Schweinenieren	78
5.4.2	Präparation von PEG-Sediment	78
5.4.3	FPLC-DEAE Blue Anionenaustauschchromatographie	79
5.4.4.1	FPLC-Resource Q-Anionenaustauschchromatographie	81
5.4.4.2	Elektroblots der eingengten Proben der Resource Q- Anionenaustauschchromatographie	82
5.4.5	Affigel blue Affinitätschromatographie	85
5.5	Bestimmung kinetischer Konstanten der N -Acetyl-S -Transferase	87
5.5.1	Präparation einer Enzym-Lösung für kinetische Untersuchungen	87
5.5.2	Temperaturstabilität der N -Acetyl-S -Transferase	90
5.5.3	Bestimmung der kinetischen Größen $K_m$ , $V_{max}$ und $V_{max} / K_m$	91
5.6	Bestimmung der DNA-Sequenz der Phagenklone	100
5.6.1	Isolierung und Restriktion der Phagen-DNA	100
5.6.2	PCR zur Amplifizierung der cDNA-Insertionen aus den Phagenklonen	101
5.6.3	Sequenzierung der cDNA-Insertionen aus den Phagenklonen	102
6.	Diskussion	107
7.	Literatur	117

## Abkürzungsverzeichnis

A <sub>280</sub>	Absorption bei 280 nm
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BIGCHAP	<i>N,N'</i> -Bis-(3-D-gluconamidopropyl)-cholamid
BIP	Binding Protein
bp	Basenpaar
BTFC	S -(2-Brom-1,1,2-trifluorethyl)-L-cystein
cDNA	copy DNA
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-propansulfonat
cmc	critical micellar concentration
CoA	Coenzym A
compdAlkan	S -[2-(Fluormethoxy)-1,1,3,3,3-pentafluorpropyl]-L-cystein
compdAlken	S -[2-(Fluormethoxy)-1,3,3,3-tetrafluor-1-propenyl]-L-cystein
CTFC	S -(2-Chlor-1,1,2-trifluorethyl)-L-cystein
Da	Dalton (Einheit der relativen Atommasse)
DBDFC	S -(2,2-Dibrom-1,1-difluorethyl)-L-cystein
DCVC	S -(1,2-Dichlorvinyl)-L-cystein
DEAE	Diethylaminoethyl-
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EC	Enzyme Commission
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathion-Disulfid
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
g	Gramm, Erdbeschleunigung
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactosid
kb	Kilobase
K <sub>m</sub>	Michaelis-Menten-Konstante
NAcT	<i>N</i> -Acetyl-S -Transferase (Cystein-S -Konjugat-spezifisch)
NAT	<i>N</i> -Acetyl-S -Transferase (Arylamin-)
NBC	S -(4-Nitrobenzyl)-L-cystein
NDSB	Nichtdetergente Sulfofetaine
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat buffered saline
PCBC	S -(1,2,3,4,4-Pentachlor-1,3-butadienyl)-L-cystein
PCR	Polymerase chain reaction
PEG	Polyethylenglykol
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rpm	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin
TCA	Trichloressigsäure
TFA	Trifluoressigsäure

---

TFEC	S -(1,1,2,2-Tetrafluorethyl)-L-cystein
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (nmol/s)
$V_{\max}$	Maximale Reaktionsgeschwindigkeit
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-indolyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid
% (v/v)	Volumen zu Volumen (Volumenprozent)
% (w/v)	Masse zu Volumen (Masseprozent)



## 1. Zusammenfassung

Lebewesen, wie auch der Mensch, sind in der Natur einer Vielzahl von schädlichen Substanzen ausgesetzt. Zum einen sind Schadsubstanzen natürlichen Ursprungs, zum anderen gelangen sie aufgrund anthropogener Wirkungen in die Biosphäre. Gegenüber organischen niedermolekularen Substanzen, die nicht für das Überleben des Organismus notwendig sind, wurden im Laufe der Evolution Mechanismen entwickelt, eine in den Körper aufgenommene Verbindung auszuschleusen. Häufig handelt es sich dabei um potentiell schädliche Chemikalien.

Die Entgiftung lipophiler Fremdsubstanzen (Xenobiotika) kann in drei Phasen unterteilt werden. In der ersten Phase findet eine Funktionalisierung des Substrates statt. Dabei wird eine funktionelle Gruppe enzymatisch auf das Substrat übertragen. In der zweiten Phase wird das funktionalisierte Substrat mit einer endogenen Verbindung, wie z.B. Glutathion, konjugiert. Dadurch wird die Polarität und somit die Hydrophilie des Xenobiotikums erhöht. Dies vermindert das toxische Potential und ermöglicht die Ausscheidung (Phase III).

Ein wichtiger Weg, über den lipophile Xenobiotika ausgeschleust werden können, ist der Mercaptursäureweg der Entgiftung. Im ersten Schritt erfolgt die Konjugation mit dem Tripeptid Glutathion. Das Glutathion-Konjugat wird in der Folge schrittweise enzymatisch zu einem Cystein-S -Konjugat hydrolysiert. Das Cystein-S -Konjugat ist das Substrat für die membrangebundene *N*-Acetyl-S -Transferase (NAcT), die Gegenstand der Untersuchungen dieser Arbeit ist. Das Cystein-S -Konjugat wird meist in der Niere acetyliert und über den Urin ausgeschieden. Es entsteht ein *N*-Acetyl-Cystein-S -Konjugat, das auch als Mercaptursäure bezeichnet wird.

Viele technisch wichtige Substanzen gehören der Stoffklasse der Haloalkane oder Haloalkene an, die über den Mercaptursäureweg entgiftet werden. Dabei können aufgrund von Konkurrenzreaktionen (z. B. katalysiert durch  $\beta$ -Lyase) toxische und cancerogene Metabolite entstehen. Die Toxizität einer Verbindung ist somit ein Maß für das Gleichgewicht, das zwischen der Acetylierung und den Konkurrenzreaktionen besteht. Für Haloalkane bzw. Haloalkene ist deshalb die Kenntnis der kinetischen Konstanten  $K_m$  und  $V_{max}$  dieser Reaktionen von Bedeutung.

Im Rahmen der Arbeit wurden die kinetischen Konstanten der *N*-Acetylierung für verschiedene Haloalkyl- und Haloalkenyl-Cystein-S -Konjugaten (von Dr. M. W. Anders, Rochester, NY zur Verfügung gestellt) bestimmt. Dazu wurde ein quantitativ auswertbarer, radioaktiver Aktivitätstest etabliert.

Das Teilreinigungsverfahren für die NAcT aus der Niere wurde optimiert und konkurrierende Enzymaktivitäten (Deacetylase, Acetyl-CoA Hydrolase) konnten vollständig, bzw. fast vollständig abgetrennt werden.

Aus einer früheren Arbeit [Aigner, 1995] lagen Phagenklone vor, die bei Durchmusterung einer cDNA-Expressionsbank mit einem gegen NAcT-spezifischen Antikörper erhalten worden waren. Die DNA-Sequenzen dieser Klone wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit ermittelt. Gemeinsame Merkmale aller cDNA-Insertionen ist die Übereinstimmung mit Proteinen, die über eine ATP-Bindestelle verfügen und an DNA binden.

## 2. Einleitung

### 2.1 Umweltchemikalien

Leben ist das Ergebnis von einer Vielzahl ablaufender biochemischer Reaktionen, für die eine große Anzahl an chemischen Verbindungen notwendig sind. Diese Verbindungen werden über die Nahrung zugeführt.

Viele der Verbindungen, denen der Mensch ausgesetzt ist, sind natürlichen Ursprungs. Es handelt sich bei diesen Verbindungen um Substanzen, die z.B. aus dem Stoffwechsel anderer Organismen stammen. Nicht immer sind diese Substanzen ungefährlich. Häufig handelt es sich dabei um Verbindungen, die schädlich auf den Menschen wirken. Im Laufe der Evolution hat sich das Leben jedoch diesen Bedingungen angepaßt und Strategien entwickelt, um derartige schädliche Substanzen nach Aufnahme in den Körper wieder ausschleusen zu können.

Außerdem kommt es durch die Lebensweise der modernen Gesellschaft vermehrt zum Eintrag von synthetischen Chemikalien in die Biosphäre. Diese künstlich hergestellten Substanzen werden Xenobiotika (Xenos = fremd) genannt.

Eine Reihe der künstlich erzeugten Verbindungen sind so mobil, daß sie allgegenwärtig (ubiquitär) sind. Zu diesen Verbindungen gehören Phthalate, Chlorkohlenwasserstoffe, polychlorierte Biphenyle (PCB), polycyclische, aromatische Kohlenwasserstoffe, Dioxine, Pentachlorphenol und das Schwermetall Cadmium.

Phthalate werden z.B. in Form von Phthalsäureester als Weichmacher für Kunststoffe, insbesondere für PVC verwendet. Weiterhin werden sie als Lösemittel, Schmierstoffe, bei der Papierherstellung, in Kosmetika, als Trägersubstanz für Pestizide und zur Herstellung von Farben und Lacken verwendet.

Polychlorierte Biphenyle stellen ein größeres Problem dar, obwohl sie in Wasser kaum löslich sind und einen hohen Siedepunkt besitzen. Sie haben sich dennoch weltweit ausgebreitet. PCB sind außerordentlich persistent und man hält im Freiland Halbwertszeiten von 10 bis 100 Jahren für möglich. Eingesetzt werden diese Verbindungen zur Herstellung von Kühl- und Isolierflüssigkeiten, als Weichmacher für Kunststoffe, für Wärmeüberträgerflüssigkeiten, Hydraulik- und Getriebeöle.

Chlorkohlenwasserstoffe werden hauptsächlich als Lösemittel und Pestizide eingesetzt. Insbesondere chlorierte Alkane und Alkene finden Verwendung als Lösungsmittel für Fette in der metallverarbeitenden Industrie. Der verhältnismäßig niedrige Siedepunkt und die bedingte Wasserlöslichkeit führten bei den chlorierten Alkanen zu einer großen Ausbreitung. Die besonders flüchtigen Verbindungen können sogar durch Betonwände und Kanalisationsrohre diffundieren und somit in das Grundwasser gelangen. Chloralkane und Chloralkene sind lipophil und lagern sich im Fettgewebe der Organismen ein. Häufig akkumulieren sie in der Nahrungskette.

Es werden zwei Gruppen von chlorierten Alkanen und Alkenen unterschieden: Stark hepatotoxisch wirkende und schwach hepatotoxisch wirkende Substanzen. Zu den stark hepatotoxisch wirkenden Verbindungen zählt das Tetrachlormethan und das 1,1,2-Trichlorethan. Tetrachlormethan dient hauptsächlich als Zwischenprodukt bei der

Herstellung von FCKWs und als Fettlöser. Es wird angenommen, daß ca. 5-10 % des hergestellten  $\text{CCl}_4$  in die Umwelt gelangt.

Zu den schwachen Lebergiften werden Trichlorethen und Tetrachlorethen (Perchlorethylen) gezählt. Tetrachlorethen ist ein in der gewerblich durchgeführten, chemischen Reinigung von Textilien weit verbreitetes Lösungsmittel für Fette. Hier gelangen erhebliche Mengen in die Umwelt. Von Tetrachlorethen werden neben der Leber auch Nerven und Nieren geschädigt. Es wird dieser Substanz eine Halbwertszeit im Freiland von 9 Monaten zugesprochen.

Einige Pestizide zählen zu der Klasse der chlorierten Kohlenwasserstoffe. Seit 1940 wurden jährlich ca.  $55 \times 10^3$  Tonnen des Insektizides Dichlordiphenyltrichlorethan (DDT) in die Umwelt eingebracht, bis die Anwendung weltweit beschränkt wurde. Aufgrund der Lipophilie dieser Verbindung und der Halbwertszeit im Freiland von ca. 10 Jahren akkumulierte dieses Pestizid in der Nahrungskette. DDT ist ein Kontaktgift, das schnell durch die Außenhaut in den Körper tritt und an den Membranen der Nervenzellen vermutlich  $\text{Na}^+$ -Pumpen inaktiviert. DDT wurde in der Bundesrepublik Deutschland verboten. Als Ersatz wurde das Pestizid Hexachlorcyclohexan ( $\gamma$ -Isomer, Handelsname Lindan) eingesetzt. Es weist ähnliche Eigenschaften wie DDT auf und akkumuliert ebenso wie DDT in der Nahrungskette. Da die Anwendungsmengen von Lindan bisher jedoch wesentlich geringer ausfielen als die von DDT, ist das weltweite Rückstandsproblem noch nicht gravierend.

## 2.2 Aufnahme von Xenobiotika

Xenobiotika werden von Säugern über die Haut, die Lungen oder über den Magen-Darm-Trakt aufgenommen und über das Blut im Körper verteilt. Die Ausscheidung erfolgt in der Regel über den Harnweg. Es gibt jedoch auch Fälle, in denen Xenobiotika über die Leber ausgeschieden werden. In einem solchen Fall gelangen die Verbindungen über die Galle in den Dünndarm. Gase und flüchtige Xenobiotika werden über die Lungen ausgeschieden.

Um über die Leber oder die Nieren ausgeschieden werden zu können, müssen Xenobiotika wasserlöslich sein. Sind diese Substanzen hydrophob, werden sie im Körper zu hydrophilen Verbindungen metabolisiert. Diese Umwandlung wird häufig auch als Biotransformation bezeichnet.

Bei der Biotransformation kann das Endprodukt oder ein Zwischenprodukt giftiger sein als die Ausgangsverbindung. Dies ist bei zahlreichen krebserzeugenden Substanzen der Fall. In einem solchen Fall spricht man auch von metabolischer Aktivierung.

Eine Übersicht über die Wege, auf denen sich ein Xenobiotikum im Körper verteilen kann, ist in Abb. 2-1 dargestellt.

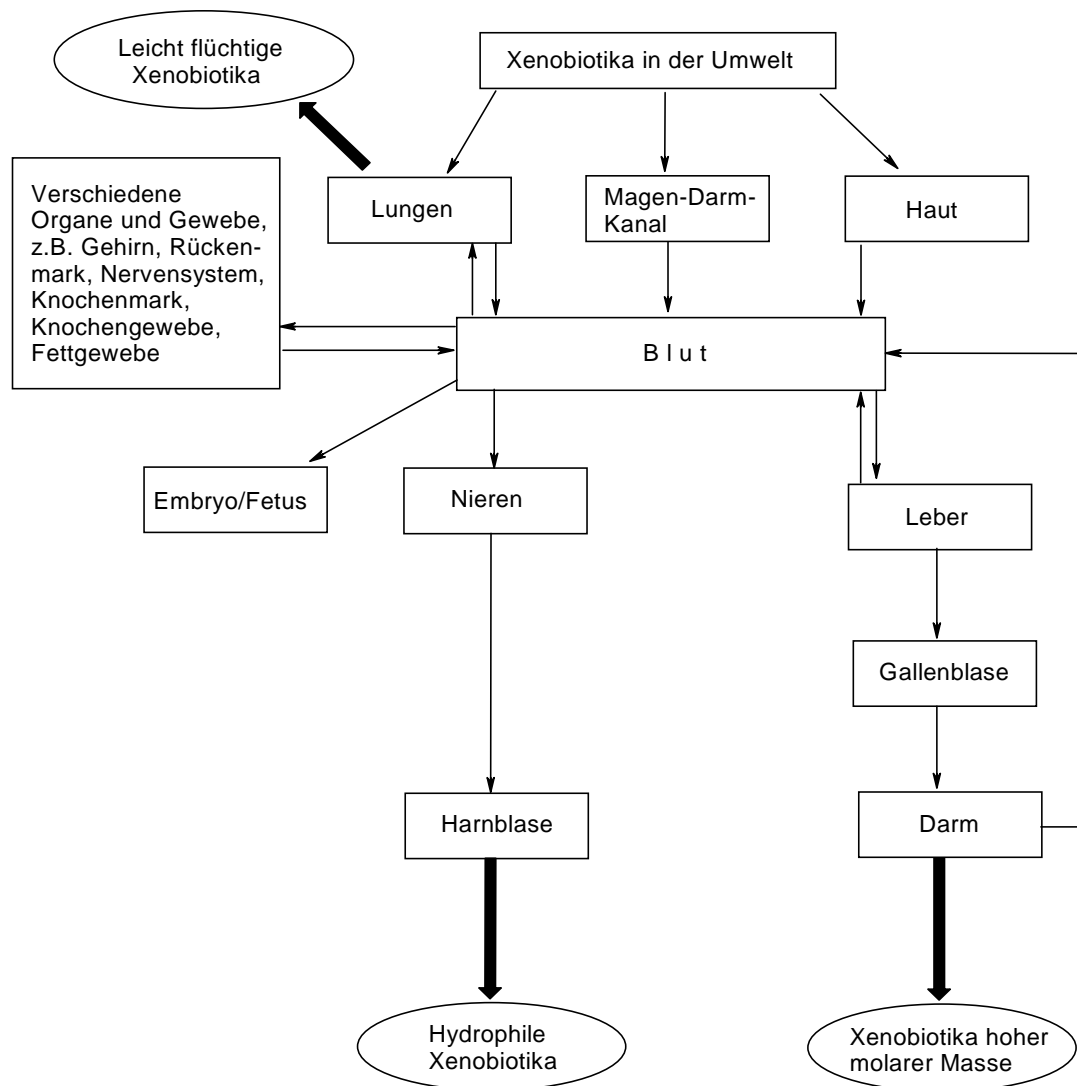


Abb. 2-1: Wege, über die sich Xenobiotika im Körper verteilen können (dicke Pfeile symbolisieren Ausscheidung) [nach Birgersson et al., 1988].

### 2.2.1 Aufnahme von Xenobiotika durch die Haut

Die Haut stellt den wirksamsten Schutz des Körperinneren gegen die Umgebung dar. Sind die Xenobiotika wasserlöslich, ist der Schutz, der durch die Haut gewährleistet wird, ausreichend. Lipophile Xenobiotika können durch die Haut diffundieren. Jedoch ist die Widerstandskraft der Haut gegenüber der Diffusion abhängig von den Körperpartien, insbesondere von der Dicke der Oberhaut (Epidermis).

Die Epidermis besteht aus mehreren Schichten dickem Epithelgewebe und ist die äußerste Hautschicht. In der untersten Schicht der Epidermis (Stratum germinativum) teilen sich die Zellen ununterbrochen. Diese wandern dann an die Oberfläche (Stratum corneum). Währenddessen sterben die Zellen ab und füllen sich mit Keratin.

Gleichzeitig verdoppelt sich die Dicke der Zellmembran. Durch den hohen Umsatz an Zellen erneuert sich so die Epidermis beim Menschen etwa alle 14 Tage, da die abgestorbenen Zellen an der Oberfläche ständig abgestoßen werden.

An den Handflächen und den Fußsohlen ist die Dicke der Epidermis am größten. An den Stellen, die durch Bewegung besonders beansprucht werden, ist sie am geringsten (z.B. an den Oberseiten der Hände und der Arme).

Unter der Epidermis liegt die Lederhaut (Cutis). Dabei handelt es sich um eine aus Bindegewebe bestehende Schicht, die mit dünnen Blutgefäßen, den sogenannten Kapillaren, durchzogen ist. Ist ein Xenobiotikum bis in die Lederhaut vorgedrungen, wird es leicht über die Kapillaren in das Blut aufgenommen und im Körper verteilt.

### 2.2.2 Aufnahme durch den Magen-Darm-Kanal

Der Magen-Darm-Kanal wird je nach Lage, Funktion und Form in mehrere Abschnitte unterteilt. Diese Einteilung umfaßt den Mund, den Schlund (Pharynx), die Speiseröhre (Oesophagus), den Magen (Gaster), den Dünndarm (Intestinum tenue) und den Dickdarm (Intestinum grassum). Hauptaufgabe dieses Systems ist die Aufnahme von Nahrungsstoffen, die bei der Passage durch den Verdauungstrakt zu kleinen Molekülen abgebaut werden. Die Nahrungsmoleküle werden dann in das Transportsystem des Körpers (Blut- und Lymphbahnen) aufgenommen. Diese Absorption kann überall in diesem System stattfinden und wird von einer Reihe aktiver Transporter, wie z.B. Aminosäuren, Glucose und Metallionen, vermittelt. Der wichtigste Ort der Absorption ist jedoch der Dünndarm. Dieser Abschnitt ist mit Darmzotten ausgekleidet, welche die effektive innere Oberfläche auf ca. 200 m<sup>2</sup> vergrößern.

Xenobiotika werden in diesem System hauptsächlich durch Diffusion aufgenommen. Die Aufnahme von lipophilen Verbindungen verläuft dabei am schnellsten.

Die Lipophilie von Xenobiotika hängt u.a. vom pH-Wert des Milieus ab. Dies ist besonders für Säuren und Basen von Bedeutung. Im Magen-Darm-Trakt finden sich unterschiedliche pH-Milieus. Das Milieu des Magens ist stark sauer (pH  $\approx$  1), da von den Belegzellen des Magens Salzsäure produziert wird. Pro Tag werden mehr als zwei Liter der Säure produziert. Aufgabe der Salzsäure ist es, native Proteine zu denaturieren und dem Verdauungsenzym Pepsin ein optimales pH-Milieu zu schaffen (pH-Wert des Mageninhaltes (Chymus)  $\approx$  3).

Nach der Passage des Magens wird der Chymus mit einem basischen Sekret aus der Bauchspeicheldrüse versetzt. Dies erhöht den pH-Wert auf ca. 5,3. Säuren werden somit im Magen leichter absorbiert, Basen im Dünndarm.

Weitere Faktoren, die die Aufnahme von Xenobiotika über den Magen-Darm-Kanal beeinflussen, sind die Verweilzeit im Magen-Darm-Kanal und die Löslichkeit des Xenobiotikums in den Verdauungssäften.

### 2.2.3 Aufnahme über die Lungen

Die Aufgabe der Lungen besteht darin, das Blut mit Sauerstoff zu versorgen und aus dem Blut Kohlendioxid zu entsorgen. Beim Einatmen wird die Luft durch die Nase und den Mund über den Schlund (Pharynx) in die Luftröhre (Trachea) gesaugt. Die Luftröhre verzweigt sich in die Bronchien, welche sich wiederum in weitere Äste (Bronchiolen) verzweigen. Die Äste verzweigen sich weiter bis in die Alveolen, auch Lungenbläschen genannt. Die Verzweigungen werden so fein, daß deren Durchmesser zum Schluß nur noch wenige Tausendstel Millimeter betragen.

Die Alveolen vergrößern die Austauschfläche auf etwa  $100 \text{ m}^2$  bei einem erwachsenen Menschen. Die Alveolen bestehen aus traubenförmig angeordneten Bläschen, die auf der Außenseite mit Kapillaren überzogen sind. Ihre Gesamtoberfläche beträgt ca.  $50 \text{ m}^2$ . Der Innenraum, in dem die Luft zirkuliert, ist von dem Blut der Kapillaren nur durch zwei Zellschichten getrennt. Der Abstand zwischen Innenraum und Blut kann bis zu einem Tausendstel Millimeter klein sein.

Xenobiotika, welche bis in die Alveolen vordringen, können sehr leicht die Membran zwischen Innenraum und Kapillaren durchdringen und in das Blut gelangen. Aus diesem Grund sind ca. 90 % der berufsbedingten Vergiftungen durch die Aufnahme über die Luft verursacht.

Damit ein Xenobiotikum über die Luft aufgenommen werden kann, muß diese Verbindung flüchtig sein, als Staubpartikel in der Luft schweben oder als Nebel vorliegen. Ein Faktor, der die Aufnahme beeinflussen kann, ist z.B. die eingeatmete Luftmenge. So atmet ein Erwachsener in Ruhe ca. 5 l Luft pro Minute ein, leistet er normale Arbeit so erhöht sich die Menge um das Vierfache auf 20 l pro Minute. Die Kapazität des Herzens nimmt gleichzeitig zu. Im Ruhezustand pumpt das Herz ca. 5 l pro Minute durch die Lungen, bei normaler Arbeit ca. 10 l pro Minute. Bei einem Xenobiotikum, das die Alveolen erreicht hat und im Blut leicht löslich ist, ist die mögliche Aufnahme erheblich erhöht.

Die Aufnahme des Xenobiotikums in das Blut kann prinzipiell im gesamten Respirationstrakt geschehen, jedoch ist die Aufnahme außerhalb der Alveolen zu vernachlässigen. Letztendlich ist entscheidend, wie weit das Xenobiotikum in die Lunge vordringen kann.

Abhängig ist das Vordringen des Xenobiotikums von der Hydrophilie der Verbindung. Da die Luftwege über die gesamte Länge mit schleimabsondernden Zellen bedeckt sind, dringen hydrophile Xenobiotika nicht tief in die Lunge vor. Diese Stoffe lösen sich bereits in dem Schleim der Nase oder des Rachens. Weiterhin gibt es in den oberen Luftwegen Rezeptoren, die auf Änderungen der Schleimzusammensetzung reagieren. Tritt z.B. eine pH-Änderung aufgrund eines im Schleim gelösten Xenobiotikums auf, kann eine Reizreaktion, wie Husten oder Niesen, ausgelöst werden. Hydrophile Xenobiotika wirken deshalb häufig irritierend. Eine Aufnahme dieser Stoffe geschieht deshalb selten in kritischen Mengen.

### 2.2.4 Die Verteilung der Xenobiotika im Organismus

Ist ein Xenobiotikum in das Blut gelangt, erfolgt die Verteilung über den gesamten Organismus. Eine schnelle Aufnahme erfolgt insbesondere in stark durchbluteten Organen wie Leber, Nieren und Gehirn. Wie schnell und in welchem Umfang die Aufnahme in den einzelnen Geweben erfolgt, hängt stark von den Transportmechanismen ab, über die ein Xenobiotikum aufgenommen werden kann. Der wichtigste Mechanismus ist die Diffusion, andere Transportmechanismen spielen jedoch auch eine Rolle.

Viele lipophile Xenobiotika werden im Blut von Proteinen gebunden. Hauptsächlich findet die Bindung an das Protein Albumin statt. Durch diese Bindung werden solche Verbindungen langsamer durch Membranen transportiert und verweilen länger im Blut. Dadurch kommt dem Blut auch eine Depotfunktion zu, die es erlaubt, eine hohe Dosis einer Fremdschubstanz aufzunehmen und über einen längeren Zeitraum wieder abzugeben. Lipophile Xenobiotika wie Ester, Alkane und Aromaten reichern sich in Fettgewebe an, wo sie im allgemeinen keine schädigende Wirkung ausüben. Dies gilt insbesondere für verschiedene Pestizide (DDT, PCB) und für Lösungsmittel. Eine Anreicherung in anderen Körpergeweben, wie Leber, Nieren, Gehirn und Rückenmark führt häufig zu Funktionsstörungen.

Der Übertritt eines Xenobiotikums in Gewebe hängt häufig auch von der Morphologie der Kapillaren ab, die alle Körpergewebe durchziehen. Überwiegend verläuft der Transport durch die Membranen per Diffusion. Es gibt jedoch Kapillaren, bei denen sich zwischen den Endothelzellen, die die Kapillaren auskleiden, Spalten befinden. Durch diese Spalten können hydrophile Verbindungen filtriert werden. Sind diese Spalten jedoch durch enge Zell-Zell-Kontakte (sogenannte tight-junctions) verschlossen, so können hydrophile Xenobiotika nicht mehr unkontrolliert in das Gewebe übertreten. Dies ist z.B. bei Kapillaren im Gehirn der Fall.

Lipophile Xenobiotika können durch hydrophobe Zellmembranen diffundieren. Dies erklärt, warum lipophile organische Quecksilberverbindungen, wie z.B. Methylquecksilberchlorid leicht in das Gehirn übertreten, hydrophile Quecksilberverbindungen (anorganische Salze mit  $\text{Hg}_2^{2+}$  und  $\text{Hg}^{2+}$ ) jedoch nicht. Metallisches Quecksilber wird leicht über die Lungen aufgenommen und kann die Blut-Hirn-Schranke aufgrund seiner Lipophilie leicht überwinden. Im Gehirn wird es zu  $\text{Hg}^{2+}$  oxidiert, das aufgrund seiner Hydrophilie aus dem Gehirn nur sehr schwer wieder ausgeschleust werden kann.

## 2.3 Die Ausscheidung von Xenobiotika

### 2.3.1 Die Leber

Die Leber spielt eine zentrale Rolle im Stoffwechsel und bei der Entgiftung von Fremdstoffen. Insgesamt ist die Leber an mehr als 500 verschiedenen Stoffwechselvorgängen beteiligt, die sowohl den katabolen- als auch anabolen Stoffwechsel betreffen.

Die Hauptfunktionen der Leber sind neben der Entgiftung:

- Die Umwandlung von Glukose in Glykogen und dessen Speicherung.
- Die Synthese von Lipiden und weiteren Fettsubstanzen wie z.B. Cholesterin.
- Der Abbau von Proteinen zu Aminosäuren und Peptiden, die der Synthese von Proteinen wieder zugeführt werden.

Bei der Leber handelt es sich um die größte Drüse des menschlichen Körpers. Sie besteht aus einem kleineren linken und einem größeren rechten Lappen. Sie liegt oben rechts in der Bauchhöhle, direkt unter dem Zwerchfell.

Die Leber wird von einer derben bindegewebigen Kapsel (Tunica fibrosa, Glissonsche Kapsel) überzogen und setzt sich aus Leberläppchen (Lobulus hepatis, Abb. 2-2) zusammen. Diese Läppchen sind von länglicher Form und haben einen Quer- bzw. Längsdurchmesser von 1-1,5 bzw. 1,5-2 mm. Die Läppchen bilden einen sogenannten Bindegewebszwickel (periportales Feld) an den Kanten, an denen drei oder mehr Läppchen zusammenstoßen. Die zuführenden Blutgefäße und die ableitenden Gallengänge (Ductus interlobulares biliferi) befinden sich an diesem periportalen Feld. Das Gesamtorgan wird aus den einzelnen Leberläppchen und deren Beziehungen zu den Blutgefäßen aufgebaut.

In der Leber werden zwei Blutkreisläufe unterschieden: der Ernährungs- und der Arbeitskreislauf. Über den Arbeitskreislauf werden Nährstoffe und Xenobiotika direkt aus dem Magen-Darm-Kanal über die Pfortader (Vena portae) in die Leber transportiert und dort metabolisiert.

Da die Sauerstoffversorgung der Leberzellen durch das Pfortaderblut nicht gedeckt werden kann, wird sauerstoffreiches Blut über den Ernährungsreislauf der Leber zugeführt. Die Zuführung erfolgt über die Leberarterie (Arteria hepatica propria), die aus der Aorta mit Blut versorgt wird. Von der Leberarterie verlaufen in die Bindegewebszwickel kleinere Äste, die sogenannten Arteriae interlobulares. Die aus Leberarterie verzweigten Kapillaren bilden mit den Gallenkapillaren, die ebenfalls die Leber durchziehen, ein feines Netz. Dadurch entsteht ein sehr enger Kontakt zwischen den Leberzellen, dem Blut und der Galle.

Das Blut verläßt die Leber wieder durch die Lebervene, die in die untere Hohlvene mündet.



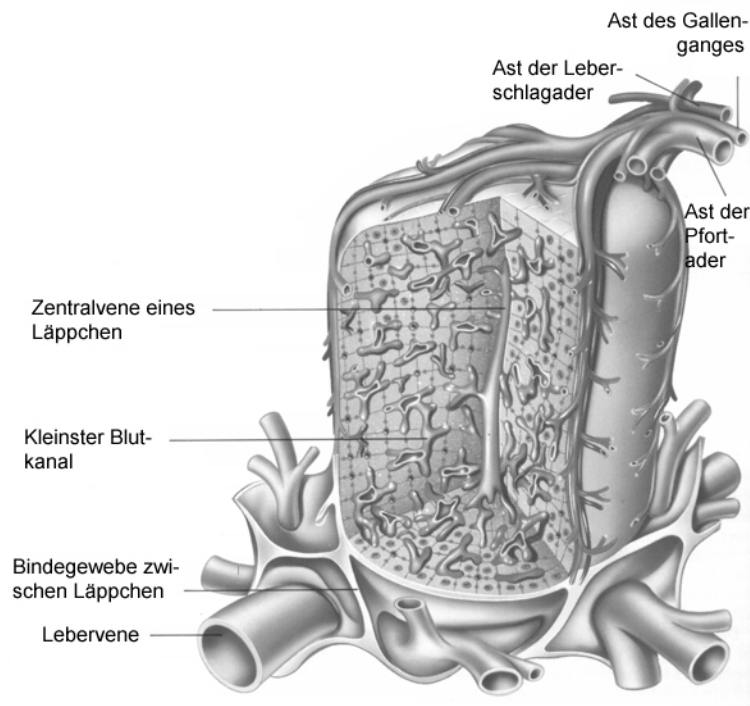


Abb. 2-2: Aufbau der Leberläppchen [Brenner, 1996].

Eine metabolisierte Fremdchemikalie kann über die Galle in den Stuhl ausgeschieden werden, oder sie wird zurück in das Blut transportiert, über das sie dann die Nieren erreicht und über den Harn ausgeschieden wird.

Viele lipophile Xenobiotika werden in der Leber zu hydrophilen Xenobiotika umgewandelt und über den Stuhl abtransportiert. Im Dünndarm können Mikroorganismen diese hydrophilen Metabolite wieder zu lipophilen Verbindungen umsetzen, so daß diese Verbindungen wieder im Dünndarm resorbiert werden und erneut in den Blutkreislauf gelangen. Über die Pfortader werden sie erneut in die Leber transportiert und dort metabolisiert. Dieser Kreislauf wird auch enterohepatischer Kreislauf genannt. Dies führt dazu, daß manche Substanzen besonders langsam aus dem Körper ausgeschleust werden und sich deren Schädigung entsprechend steigert.

### 2.3.2 Die Nieren

Das Ableiten der in Wasser löslichen Xenobiotika und Stoffwechselprodukte geschieht über das Harnsystem, welches aus Nieren, den Harnleitern, der Harnblase und der Harnröhre besteht.

Zusätzlich kommt den Nieren die wichtige Aufgabe zu, den Wasser- und Elektrolythaushalt des Organismus zu regulieren. Am Intermediärstoffwechsel sind sie ebenfalls beteiligt. Hieraus ergibt sich für die Nieren, daß sie einen schwierigen Balanceakt zwischen dem Ausscheiden bei einem Überangebot und dem Einsparen bei einem Mangel meistern müssen.

Die Nieren werden bei einem Erwachsenen täglich von ca. 1700 l Blut durchströmt, d.h. das 15-fache Blutvolumen durchfließt pro Stunde die Nieren. Dabei werden pro Tag ca. 180 l Primärharn aus dem Blut filtriert. In den Nierenröhrchen (Tubuli) werden von diesem Primärharn ca. 99 % rückresorbiert. Die lebensnotwendigen wasserlöslichen Stoffe sind darin inbegriffen.

Die Nieren liegen paarig im oberen rückwärtigen Bindegewebsraum (Retroperitonealraum) des Bauches und haben die Form einer Bohne. Eine einzelne Niere ist beim erwachsenen Menschen ca. zehn Zentimeter lang, fünf Zentimeter breit, vier Zentimeter dick und wiegt zwischen 120 und 300 Gramm. Sie ist mit einer bindegewebigen Kapsel (Capsula fibrosa) überzogen und ist mit der Nebenniere in die Fettkapsel (Capsula adiposa) eingebaut.

Wird eine Niere längs aufgeschnitten (s. Abb. 2-3), so erkennt man bereits mit dem bloßen Auge die Zonen Rinde und Mark, die sich deutlich in Struktur und Färbung unterscheiden.

Das Nierenmark (Medulla renalis) besteht im Regelfall aus 7-9, maximal aus 14 Markpyramiden (Pyramides renales). Die Markpyramiden ragen mit ihren Enden, den Markpapillen (Papilla oder Cristae renales) in die Kelche des Nierenbeckens hinein. Zwischen der Capsula fibrosa und den Markpyramiden befindet sich eine ca. 7-10 mm breite gekörnte Zone, die Nierenrinde (Cortex renalis). Diese dehnt sich auch als Columnae renales in Richtung der Vertiefung, an der der Ureter austritt (Hilum), zwischen den Markpyramiden aus. Die Nierenrinde kann in Markstrahlen (Pars radiata) und Rindenlabyrinth (Pars convoluta) unterschieden werden.

Mark und Rinde umfassen die sich am Hilum nach außen öffnende Höhlung, den Sinus renalis. Dieser enthält das Nierenbecken mit seinen Kelchen, Gefäßen, Nerven und Fettgewebe.

Die Filtration des Blutes und damit die Harnbereitung erfolgt in der kleinsten funktionellen Einheit der Niere, im Nephron (Nierenkörperchen, s. Abb. 2-4). Hier wird der eiweißarme Primärharn aus dem Blutplasma gebildet. Eine Niere eines erwachsenen Menschen verfügt über ca. 2,5 Millionen dieser auch Mikrofilter genannten Nephrone.

Die Nephrone bestehen aus der Bowman-Kapsel (Capsula glomeruli) und einem innenliegenden Gefäßknäuel (Glomerulus). Beide zusammen bilden das Nierenkörperchen mit einem Durchmesser von 150-250 µm. Diesem schließt sich ein zunächst gewundener Tubulus (proximales Konvolut) an, der in einen geraden Teil (Pars recta) übergeht. Der Tubulus macht eine Schleife (Henle-Schleife), um wiederum in einen gewundenen Teil (distales Konvolut) überzugehen. Der Tubulus endet dann wieder im Nierenkörperchen. Zusammen mit anderen Harnkanälchen mündet er schließlich in den Sammelrohren. Diese gehen an der Nierenpapille in das Nierenbecken und den Harnleiter über. Zusammen mit der Schleife hat ein Nephron eine Länge von ca. 3-4 cm.

Die Nierenkörperchen liegen benachbart zu den gewundenen Tubuli in der Nierenrinde, die geraden Teile der Tubuli, die Henle-Schleifen und die Sammelrohre, liegen im Mark.

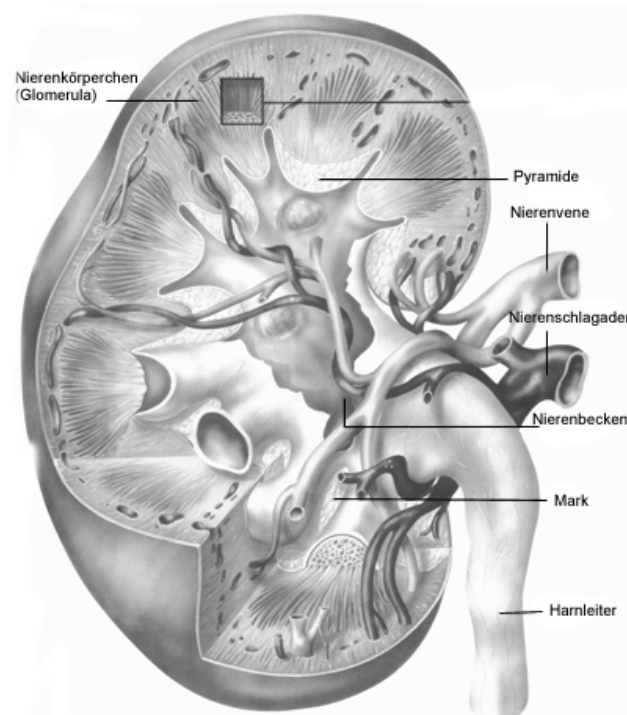


Abb. 2-3: Aufbau einer Niere [Brenner, 1996].

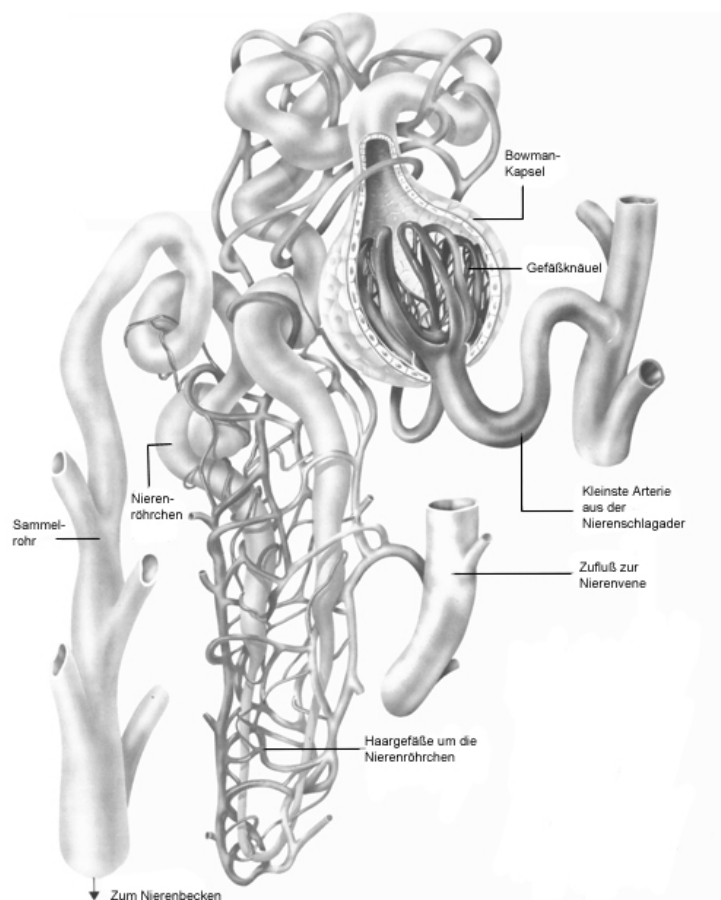


Abb. 2-4: Aufbau der Nephron [Brenner, 1996].

## 2.4 Biotransformation von Xenobiotika

Aufgrund ihrer chemischen Struktur können Xenobiotika meist nicht in die normalen Stoffwechselwege eingeschleust werden. Sie müssen daher über spezielle Mechanismen aus den Körper ausgeschieden werden.

Bei Xenobiotika unterscheidet man prinzipiell zwei Extremfälle: Die Substanz ist gut wasserlöslich oder das Xenobiotikum ist völlig wasserunlöslich. Handelt es sich um eine hydrophile Verbindung, so kann sie leicht über die Nieren ausgeschieden werden. Lipophile Substanzen können jedoch erst nach einer chemischen Transformation (Biotransformation) ausgeschleust werden. Die Modifikation von Xenobiotika wird durch Enzyme katalysiert und ist für das Überleben sämtlicher Organismen essentiell. Es ist daher nicht erstaunlich, daß das Prinzip der Biotransformation in der Phylogenese der Arten beibehalten wurde.

Hauptort der Biotransformation bei Säugern ist die Leber. Die an der Biotransformation beteiligten Enzyme finden sich auch in anderen Organen, wie Niere, Darm, Lunge, Haut, Herz und Gehirn.

Die direkte Eliminierung von Xenobiotika ist eine aktive Ausschleusung über Transmembranpumpen mit geringer Spezifität aber hoher Substratbreite. Die Transmembranpumpen werden aus P-Glykoproteinen gebildet.

Erstmals wurden P-Glykoproteine bei Untersuchungen zur sogenannten „multidrug resistance“ von Tumorzellen beschrieben [Juliano und Ling, 1976; Endicott und Ling, 1989]. P-Glykoproteine gehören zu der Proteinfamilie der ABC-Translokasen („ATP-binding cassette“) [Lewis, 1994]. Die Proteine sind 140 bis 170 kDa groß, bestehen aus zwei homologen Hälften mit vermutlich jeweils sechs Transmembrandomänen und sind in der Plasmamembran verankert. Weiterhin besitzen diese Proteine eine intrazelluläre ATP-Bindestelle [Chen et al., 1986; Gros et al., 1986].

Der zelluläre Phänotyp der „multidrug resistance“ wird über die Ausschleusung einer Vielzahl von strukturell nicht verwandter amphiphiler Verbindungen aus der Zelle vermittelt. Daraus resultiert eine Unempfindlichkeit gegenüber chemotherapeutischen Reagenzien. Diese Resistenz kann intrinsischen Charakter, d.h. von Beginn an vorliegend, oder erworbenen Charakter, durch eine Chemotherapie induzierte Resistenz, haben [Pearson und Cunningham, 1993]. Die Resistenz erweist sich als Problem, da durch P-Glykoproteine die intrazelluläre Konzentration der pharmakologisch wirksamen Substanz und damit der cytotoxische Effekt stark abnimmt. Dies kann zum Fehlschlagen der Chemotherapie führen. Es wird jedoch vermutet, daß die „multidrug resistance“ nicht alleine auf die P-Glykoproteine zurückzuführen sei, sondern daß auch andere Resistenzmechanismen eine Rolle spielen [Pearson und Cunningham, 1993].

Die funktionellen P-Glykoproteine finden sich jedoch nicht nur in Tumorzellen, sondern auch in anderen Geweben [Thiebaut et al., 1987; Suguwara et al., 1988]. Weit verbreitet sind sie in Epithelzellen mit sekretorischer bzw. exkretorischer Funktion, in Trophoblasten, welche die Außenwand des Keimbläschens bilden, und in den Endothelzellen kapillärer Blutgefäße mit Schrankenfunktion, z.B. der Blut-Hirn-Schranke [Cordon-Cardo et al., 1989].

P-Glykoprotein-knock out-Mäuse zeigen eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber einem verabreichten Pestizid oder Carcinostatikum und eine höhere Konzentration der entsprechenden Substanz in vielen Organen. Aus diesem Befund wurde abgeleitet, daß P-Glykoproteine eine zweifache Wirkung entfalten. Sie verursachen

- den Abtransport der Verbindung aus bestimmten Geweben und vermindern damit die Akkumulation der Substanz,
- die Senkung der Konzentration der Substanz im Plasma durch vermehrtes Ausschleusen, wahrscheinlich durch Stimulation der Exkretion über Galle und Urin.

Die Biotransformation von Xenobiotika wird in drei Phasen unterteilt [Ishikawa, 1992; Sandermann, 1992]:

Phase I:	Funktionalisierung	Oxidation, Reduktion und Aromatisierung, Dealkylierung oder Hydrolyse lipophiler Substrate zur Einführung einer funktionellen Gruppe
Phase II:	Konjugation	Verknüpfung der Verbindung mit einem polaren endogenen Substrat (Aminosäure, Sulfat, Glutathion oder Zucker) zur Erhöhung der Polarität, zur Verminderung des toxikologischen Potentials und zur schnellen Exkretion
Phase III:	Elimination/Speicherung	Exkretion über Niere oder Darm, bei Pflanzen erfolgt Kompartimentation und Speicherung in Vakuolen bzw. in der Zellwand

Die Metabolisierung von lipophilen Xenobiotika ist häufig ein Prozeß, der über verschiedene Zwischenstufen ein oder mehrere Produkte liefert. Nach Minn et al. [1991] ist dies u.a. abhängig von den biochemischen Charakteristiken der Enzyme, der Substratkonzentration, die Zugänglichkeit der aktiven Zentren der Enzyme für die Substrate, der Präsenz kompetitiver Substrate, der Verfügbarkeit von Cosubstraten bzw. Coenzymen oder Cofaktoren und der hormongesteuerten Aktivierung oder Inhibierung der Enzyme. Weiterhin ist von Wichtigkeit, ob bei den beteiligten Enzymen Polymorphismus auftritt.

Enzyme der Phase I und II zeigen beim Menschen eine weite interindividuelle Variation auf Expressionsebene. Diese Variation liegt hauptsächlich im Polymorphismus der Gene begründet. Der am besten studierte und verstandene Polymorphismus ist der der Cytochrom P-450-Superfamilie. Gleichzeitig stellt dieser auch für medizinische Therapien den wichtigsten Polymorphismus dar [Daly, 1995]. Die wichtige Proteinsuperfamilie der Cytochrome P-450 fungiert als Monooxygenasen und katalysiert die Oxidation einer großen Anzahl von Verbindungen. Mit den Cytochromen, welche Hämproteine darstellen, ist ein Flavoprotein, die NADPH-Cytochrom P-450-Reduktase assoziiert. In diesem Enzymsystem stellt das Cytochrom die Substrat- und Sauerstoff-Bindestelle dar, die Reduktase fungiert als Elektronenüberträger von NADPH auf das Cytochrom. Bei Säugern werden zwei Klassen an Cytochrom P-450 Proteinen unterschieden: Die erste Klasse katalysiert die Synthese von Steroiden und

Gallensäuren. Die zweite Klasse ist an der oxidativen Umsetzung von Xenobiotika und von endogenen lipophilen Substanzen beteiligt [Gonzalez, 1992]. Einige der Cytochrom P-450-Enzyme sind in der Niere induzierbar und spielen eine wichtige Rolle für die physiologische Funktion der Niere [Capdevila et al., 1992; Kim et al., 1992; Makita et al., 1994, 1996; Nakamura et al., 1994; Zanelli et al., 1996; Zangar et al., 1996]. Beim Menschen wurden bislang 18 verschiedene Gene identifiziert, welche für Cytochrome P-450 codieren.

Für Enzyme der Phase II wurden ebenfalls verschiedene Polymorphismen beschrieben. Gut untersucht ist dies für zwei Arylamin-*N*-Acetyltransferasen, die beim Menschen mit NAT1 und NAT2 bezeichnet werden. Eine Folge aus diesem Polymorphismus ist, daß zwischen Individuen nach ihrer Fähigkeit zum schnellen oder langsamen Acetylieren von Verbindungen unterschieden werden kann [Blum et al., 1991; Coroneos et al., 1991; Kelly und Sim, 1994; Dupret et al., 1994; Wild et al., 1995]. Verantwortlich für dieses Unterscheidungsmerkmal ist das Enzym NAT2, dessen Gen beim Menschen auf dem Chromosom 8 lokalisiert ist [Blum et al., 1990]. NAT1 zeigt eine weite Verbreitung in Geweben und Organen, NAT2 findet sich nur in Darm und Leber. NAT2 zeichnet den „klassischen“ Polymorphismus aus, NAT1 jedoch zeigt ebenfalls genetische Varianten. Die Konsequenzen, die sich aus dem Polymorphismus bei der Acetylierung von Arylaminen ergeben, sind vielfältig. Epidemiologische Studien haben gezeigt, daß ein Zusammenhang zwischen dem Acetylatorphänotyp und einem Krebsrisiko besteht. Es zeigt sich zum Beispiel ein erhöhtes Blasenkrebsrisiko bei Arbeitern, die in der Arylaminfarbindustrie arbeiten und den Phänotyp der langsamen Acetylatores aufweisen [Evans, 1989].

Die wichtigsten Stoffwechselprozesse der Phase I und II für Xenobiotika sind in der nachstehenden Tabelle aufgeführt. Aufgrund der Vielzahl von Reaktionen bei der Entgiftung von Xenobiotika kann dies nur ein unvollständiger Überblick sein.

Tab. 2-1: Wichtige Enzyme der Entgiftung und deren katalysierte Reaktionen.

Enzym	Katalysierte Reaktion	Beispielsubstrate	Produkte
<b>Phase I</b>			
Monoamin-Oxidasen	Oxidative Desaminierung	Prim., sek. und tert. Amine	Aldehyde, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , NH <sub>3</sub>
Cytochrom P-450	Hydroxylierung, N-Demethylierung, Epoxidierung	Lipide, Steroide, polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe	Hydroxylierte Verbindungen, Steroide, freie Radikale
NADPH-Cytochrom-P-450-Reduktase	Reduktion	Cytochrom P-450	
Epoxid-Hydrolasen	Hydrolyse von Epoxiden	Epoxide	Vicinale Dirole
<b>Phase II</b>			
UDP-Glucuronosyltransferasen	Glucuronidierung	1-Naphtol, p-Nitrophenol	Entsprechende Glucuronsäuren
Phenol-Sulfotransferase	Sulfokonjugation	Phenolderivate	Entsprechende Sulfate
Glutathion-S - Transferase	Verknüpfung mit Glutathion	Hydrophobe Elektrophile (Halogenide, Epoxide usw.)	Entsprechende Glutathion-Konjugate
N -Acetyltransferasen	N -Acetylierung	Aromatische Amine	Entsprechende acetylierte Verbindungen

## 2.5 Entgiftung lipophiler Xenobiotika

Lipophile Xenobiotika können über verschiedene Stoffwechselwege metabolisiert und ausgeschleust werden. Der Weg, über den dies geschieht, ist u.a. abhängig von der Struktur der zu metabolisierenden Verbindung. Halogenierte Alkane und Alkene werden über verschiedene Schritte zu acetylierten Cystein-S-Konjugaten, den sogenannten Mercaptursäuren, umgesetzt.

### 2.5.1 Der Mercaptursäureweg der Entgiftung

Die Bildung von Glutathion-S-Konjugaten von Xenobiotika und deren elektrophilen Metaboliten wurde schon sehr früh mit der Entgiftung in Zusammenhang gebracht. Diese Konjugation stellt den einleitenden Schritt des Mercaptursäureweges der Entgiftung dar.

Das Tripeptid Glutathion ( $\gamma$ -Glu-Cys-Gly) hat vielfältige Funktionen in der Säugerzelle, was sich u.a. in seiner hohen Konzentration von bis zu 10 mM zeigt. Es liegt hauptsächlich in der reduzierten Form vor, kann jedoch reversibel zu Glutathion-Disulfid (GSSG) oxidiert werden. Es stellt damit ein wichtiges Reduktionsmittel für die Zelle dar.

und dient u.a. zum Schutz vor oxidativem Streß [Lash und Anders, 1988]. Weiterhin wird dem Glutathion eine Beteiligung an Aminosäuretransportprozessen zugeschrieben [Orlowski und Meister, 1970; Meister, 1973].

Der erste Schritt des Mercaptursäureweges wird durch das Enzym Glutathion-S-Transferase katalysiert. Glutathion-S-Transferasen zeichnen sich durch zwei Eigenschaften aus: Sie katalysieren den nukleophilen Angriff des Glutathionthiolatanions an elektrophile Kohlenstoff-, Schwefel-, Stickstoff- und Sauerstoffatome. Weiterhin akzeptieren sie als Liganden nur lipophile Verbindungen [Keen und Jakoby, 1978; Jakoby und Habig, 1980]. Diese Enzyme sind mitochondrial und mikrosomal, zumeist aber cytosolisch in der Zelle lokalisiert und weitverbreitet [Chasseaud, 1974; Habig et al., 1974; Chasseaud, 1980].

Der gebildete Thioether ist das Substrat für die  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase. Durch dieses Enzym wird die Abspaltung des Glutamatrestes von dem Thioether katalysiert. Dies geschieht entweder über Transpeptidierung oder Hydrolyse. Das Enzym ist an der äußeren Oberfläche der Plasmamembran lokalisiert. Somit muß der Thioether über einen ATP-abhängigen Glutathion-S-Konjugat-spezifischen Transporter aus der Zelle transportiert werden [Ishikawa, 1992].

Das gebildete Produkt ist ein S-substituiertes Cysteinylglycin. Dieses Konjugat dient den Enzymen Aminopeptidase M und Cysteinylglycin-Dipeptidase als Substrat, welche die hydrolytische Abspaltung des Glycinrestes katalysieren [Hughey et al., 1978; Kozak und Tate, 1982]. Die Cysteinylglycin-Dipeptidase scheint jedoch eine höhere Affinität zu dem Substrat zu haben als die Aminopeptidase M [Kozak und Tate, 1982].

Anschließend erfolgt Acetylierung des Cystein-S-Konjugats durch die Cystein-S-Konjugat-spezifische N-Acetyl-S-Transferase. Dieses Enzym ist Gegenstand dieser Arbeit und wird später ausführlicher behandelt. Die so gebildeten N-acetylierten Cystein-S-Konjugate werden Mercaptursäuren genannt. Die Konjugate sind weniger toxisch als die Ausgangsverbindung und sind hydrophiler, was deren Ausschleusung aus dem Organismus über den Urin ermöglicht. Die Abgabe in den Urin erfolgt über einen Probenecid- (4-Dipropylsulfamoylbenzoesäure) spezifischen Transporter für organische Anionen [Inoue et al., 1981; Lock et al., 1986; Schrenk et al., 1988].

Beim Mercaptursäureweg handelt es sich um einen komplexen Interorganprozeß, an dem verschiedene Organe beteiligt sind. Dieses Ergebnis basiert auf Enzymaktivitätstests und Untersuchungen mit radioaktiv markierten Xenobiotika *in vivo*.

Die Konjugation des Xenobiotikums mit Glutathion findet hauptsächlich in der Leber statt, die Abspaltung von Glutamat und Glycin hauptsächlich in der Niere [Meister und Tate, 1976; Modeus et al., 1978; Orrenius et al., 1983], aber auch im Gallengang und Dünndarm [Tate und Meister, 1974; Grafström et al., 1979; Wahlländer und Sies, 1979; Bakke et al., 1981]. Diese Befunde stützen sich auf die gefundenen hohen Aktivitäten der entsprechenden Enzyme in den Organen.

Es wird jedoch auch vermutet, daß es bei einigen Säugern Unterschiede bei der Metabolisierung der Glutathion-S-Konjugate gibt, und die Leber auch Ort der weiteren Umsetzung der Konjugate ist [Hinchman und Ballatori, 1990; Hinchman et al., 1991].



Man nimmt außerdem an, daß inhalierte Xenobiotika gleich in der Lunge konjugiert werden [Hinchman et al., 1991].

Nachdem Cystein-S-Konjugate in der Niere gebildet wurden, werden sie wieder in die Leber transportiert, die vermutlich der Hauptort der *N*-Acetylierung ist [Inoue et al., 1982; Inoue et al., 1984]. *N*-Acetylierung findet jedoch auch in der Niere statt [Jakoby et al., 1984], die über eine höhere Aktivität der *N*-Acetyl-S-Transferase verfügt als die Leber [Green und Elce, 1975; Hughey et al., 1978; Inoue et al., 1982; Lock und Ishmael, 1984]. Cystein-S-Konjugate mit einer hohen Affinität zur *N*-Acetyl-S-Transferase werden wahrscheinlich direkt in der Niere acetyliert, wohingegen Konjugate mit geringer Affinität in der Leber acetyliert werden [Inoue et al., 1984], um dann über die Nieren ausgeschieden zu werden.

Nicht immer stellt dieser Weg der Entgiftung jedoch ein Schutzsystem für die Zelle dar, da häufig toxische Metabolite gebildet werden [Anders et al., 1988; Dekant et al., 1989; Monks et al., 1990; Anders, 1991; Hanigan et al., 1994].

Der Mercaptursäureweg der Entgiftung repräsentiert eine Neutralisierung hochelektrophiler Komponenten durch Reaktion mit Glutathion als physiologisches Nucleophil. Bei dem vorletzten Schritt dieses Weges kann es zu einer Hydrolyse des Cystein-S-Konjugats kommen [Tateishi et al., 1978; Tateishi et al., 1980]. Das Produkt dieser Hydrolyse ist ein freies Thiol, welches anschließend methyliert wird [Weisinger und Jakoby, 1979]. Dieser Weg stellt eine Konkurrenzreaktion zu der durch die *N*-Acetyl-S-Transferase katalysierten Acetylierung des Cystein-S-Konjugats dar und wird als „Shunt“ bezeichnet. Die beiden Enzyme, die den „Shunt“ katalysieren, sind die  $\beta$ -Lyase und die S-Methyltransferase.

Die Cystein-Konjugat  $\beta$ -Lyase, welche den ersten Schritt katalysiert, hydrolysiert bei Cystein-S-Konjugaten die Bindung zwischen dem  $\beta$ -Kohlenstoffatom des Cysteins und dem Schwefel. Dabei werden reaktive Thiole, Ammoniak und Pyruvat gebildet.

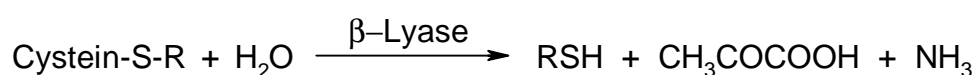


Abb. 2-5: Durch die  $\beta$ -Lyase katalysierte Hydrolyse von Cystein-S-Konjugaten.

Diese Reaktion liefert häufig reaktive, nephrotoxische Thiol-Metabolite. Eine biologische Funktion konnte dieser Reaktion bislang noch nicht zugesprochen werden [Stevens und Jakoby, 1983].

Ein Beispiel ist die Umsetzung von Dichlorovinyl-L-Cystein durch die  $\beta$ -Lyase. Diese Umsetzung wird für die hohe Toxizität dieser Verbindung verantwortlich gemacht [Anderson und Schulze, 1965]. Es ist bekannt, daß diese Reaktion einen reaktiven Metaboliten liefert, der kovalent an Proteine [Anderson und Schulze, 1965] und DNA [Bhattacharya und Schulze, 1972] bindet. Dies führt zur Zellschädigung.

Die Aktivität der  $\beta$ -Lyase findet sich sowohl in Rattenleber [Tateishi et al., 1978; Stevens und Jakoby, 1983], als auch in Rattenniere [Dohn und Anders, 1982; Stevens und Jakoby, 1983] und in der Darmflora [Bakke und Gustafsson, 1984]. In unterschiedlichen

Gewebe scheinen jedoch unterschiedliche Enzyme vorzuliegen. Ein Antikörper gegen das homogene Leberenzym zeigt keine Kreuzreaktion mit einer 100-fach angereicherten  $\beta$ -Lyase aus Rattenniere [Stevens und Jakoby, 1983].

Die Thiol-S-Methyltransferase, welche den zweiten Schritt des „Shunts“ katalysiert, ursprünglich für mikrosomale Präparationen aus Rattenleber beschrieben, findet sich auch in anderen Geweben [Bremer und Greenberg, 1961]. Die von der  $\beta$ -Lyase gebildeten reaktiven Thiole werden *in vivo* zu Methylthio-Derivaten bzw. deren S-oxidierten Folgeprodukten umgesetzt [Richardson et al., 1991]. Obwohl es sich bei der Thiol-S-Methyltransferase um ein membranständiges Protein handelt, findet man auch eine lösliche Form. Die lösliche Form ist jedoch sehr instabil. Das isolierte Enzym hat eine Molmasse von 28 kDa.

Während die Acetylierung der Cystein-S-Konjugate deren Hydrophilie steigert, führt der „Shunt“ zu lipophileren Verbindungen, da die Methylierung die Hydrophobizität steigert. Dies führt dazu, daß viele toxische Metabolite weitere Entgiftungsreaktionen durchlaufen müssen bzw. durch längere Verweilzeiten im Körper akkumulieren.

Eine Desacetylase (Aminoacylase), welche die Acetylgruppe der Mercaptursäuren hydrolysiert und somit die Acetylierung reversibel macht, wurde ebenfalls beschrieben [Tateishi et al., 1978; Suzuki und Tateishi, 1981]. Das Enzym macht somit die Mercapturate dem „Shunt“ wieder zugänglich.

Somit hängt die Ausschleusung der Mercaptursäuren nicht nur von der N-Acetyl-S-Transferase-Aktivität ab, sondern wird durch ein empfindliches Zusammenspiel von konkurrierenden Enzymen beeinflusst. Dieses Zusammenspiel ist abhängig von dem Gleichgewicht der Acetylierung und Desacetylierung, der Reaktivität der gebildeten Metaboliten und des Interorgantransportes. Von diesem Zusammenspiel hängt es ab, ob und wie stark ein lipophiles Xenobiotikum toxisch wirkt [Schaeffer und Stevens, 1987; Boogard et al., 1989; Commandeur et al., 1991a, 1991b].

Einen Überblick über den Mercaptursäureweg der Entgiftung und den hier vorgestellten Nebenreaktionen gibt Abbildung 2-6.

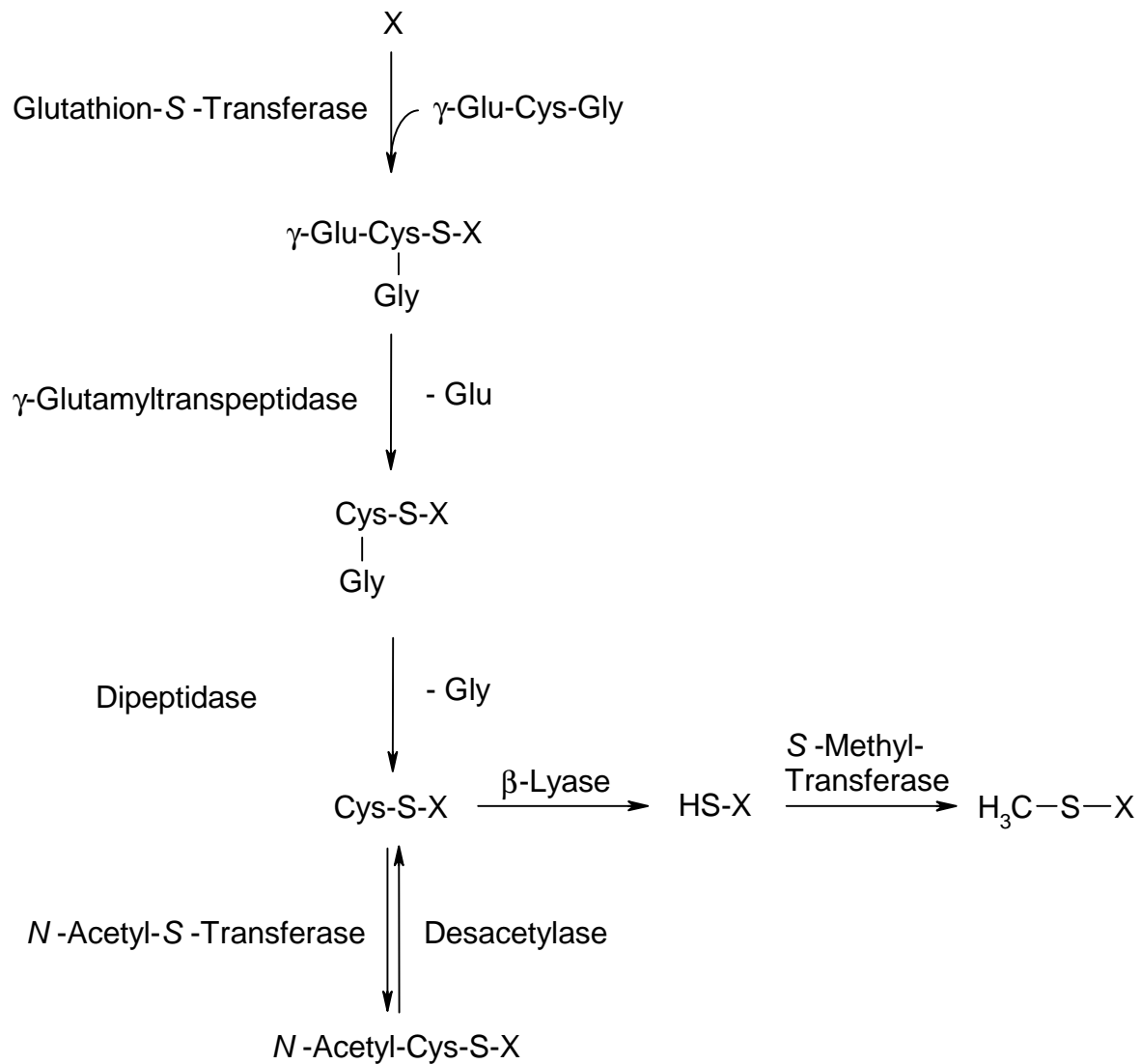


Abb. 2-6: Übersicht über den Mercaptursäureweg der Entgiftung und der möglichen Nebenreaktionen [nach: Elfarra und Anders, 1984; Anders et al., 1988; Bakke und Gustafsson, 1984].

## 2.5.2 Entgiftung von halogenierten lipophilen Xenobiotika

Toxische Metabolite können aus drei verschiedenen Klassen von Verbindungen gebildet werden:

- Haloalkanen
- Haloalkenen
- Hydrochinonen und Aminophenolen

Für die Klassen der Haloalkane und Haloalkene sind folgende Beispiele erläutert.

Die vicinalen Dihaloalkane 1,2-Dichlor-, 1,2-Dibrom- und 1-Brom-2-chlorethan sind toxisch und carcinogen [Spencer et al., 1951; Weisburger, 1977]. Die Bildung der toxischen Metabolite umfaßt zwei Wege: Eine Cytochrom P-450 abhängige Oxidation und die Konjugation mit Glutathion [Guengerich, 1980].

Ausgehend von den Verbindungen 1,2-Dichlor- bzw. 1,2-Dibromethan werden durch Oxidation die Aldehyde Chloracetaldehyd bzw. Bromacetaldehyd gebildet, welche in Verdacht stehen, an Proteine kovalent zu binden.

Die Konjugation mit Glutathion führt im Falle des 1,2-Dibromethan zu S-(2-Bromethyl)-glutathion, im Falle der Verbindungen 1,2-Dichlor- bzw. 1-Brom-2-chlorethan zu S-(2-Chlorethyl)-glutathion. Bei allen dieser Konjugationen stellt sich ein Gleichgewicht zwischen dem Glutathion-Konjugat und dem elektrophilen Episulphoniumion ein (s. Abb. 2-7). Dieses Episulphoniumion ist ein starkes Alkylierungsreagenz [Dohn und Casida, 1987]. Das Konzept des Episulphoniums als Intermediat im Metabolismus von vicinalen Dihalogenethanen wird unterstützt durch Struktur/Aktivitätsbeziehungen bei der Mutagenität von *N*-Acetyl-S-(2-Haloalkyl)-L-Cysteinen [van Bladeren et al., 1979], der Stereochemie von gebildeten DNA-Addukten [Petersen et al., 1988] und aufgrund von NMR-Daten [Dohn und Casida, 1987].



Abb. 2-7: Entgiftung von halogenierten Alkanen am Beispiel des 1,2-Dibromethans (GSH: Glutathion) [nach: Dekant und Vamvakas, 1993].

Die halogenierten Alkene Hexachlorbutadien, Pentafluorpropen und Chlortrifluorethen sind selektiv nephrotoxisch in der Ratte und induzieren einen Schaden in den proximalen Tubuli der Nieren [Reichert et al., 1975; Potter et al., 1981; Ishmael et al., 1982].

Nephrotoxische Haloalkene werden von der mikrosomalen und auch von cytosolischen Glutathion-S-Transferasen zu Glutathion-S-Konjugaten umgesetzt. Hierbei zeigt jedoch die mikrosomale Fraktion aus Leber eine 2- bis 10-fach höhere Aktivität in bezug auf Haloalkene als die cytosolische Fraktion [Dekant und Vamvakas, 1993].

Als Beispiel für die Metabolisierung von Haloalkenen wird die Biosynthese von toxischen Glutathion-S-Konjugaten ausgehend von Chloralkenen betrachtet (s. Abb. 2-8).



Fluoralkenyl- und Chloralkenyl-Cystein-S-Konjugate werden von der  $\beta$ -Lyase zu instabilen Thiolen metabolisiert. Die Thiole stellen reaktive Elektrophile dar [Dekant et al., 1987a, 1988c, d]. Thioketene werden aus Enthiolen gebildet, die aus der  $\beta$ -Lyase hydrolysierten Halovinyl-Cystein-S-Konjugaten entstehen [Dekant et al., 1991]. Diese Thioketene sind hochpotente Acylierungsreagenzien und reagieren mit Nukleophilen. Nur solche S-Konjugate, die diese Acylierungsreagenzien bilden können, sind mutagen und cytotoxisch in Nierenzellen [Vamvakas et al., 1988b; 1989e].

### 2.5.3 Die Cystein-S-Konjugat-spezifische *N*-Acetyl-S-Transferase (EC 2.3.1.80)

Die Cystein-S-Konjugat-spezifische *N*-Acetyl-S-Transferase katalysiert den letzten Schritt des Mercaptursäureweges, die *N*-Acetylierung von Cystein-S-Konjugaten.

Das Enzym ist in Leber und Niere, wo es auf der cytosolischen Seite des endoplasmatischen Reticulums lokalisiert ist [Tate, 1980; Okajima et al., 1984], nachgewiesen worden. Dies ist in Übereinstimmung mit dem Befund, daß die Enzyme  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase und Dipeptidase ebenfalls in diesen Organen gefunden wurden. Im Unterschied zu den beiden Ektoenzymen stellt die Lokalisation der *N*-Acetyl-S-Transferase auf der cytosolischen Seite wahrscheinlich sicher, daß der ausschließlich intrazellulär vorkommender Cofaktor Acetyl-CoA in ausreichenden Mengen zur Verfügung steht. Weiterhin wurde das Enzym in geringen Mengen im Dünndarm [Inoue et al., 1987] von Ratten nachgewiesen. Die höchste Konzentration des Enzyms findet sich in der Niere, dem äußeren Mark und im Cortex.

Durch das Enzym wird die Übertragung einer Acetylgruppe von Acetyl-CoA auf ein Cystein-S-Konjugat katalysiert (s. Abb. 2-9).

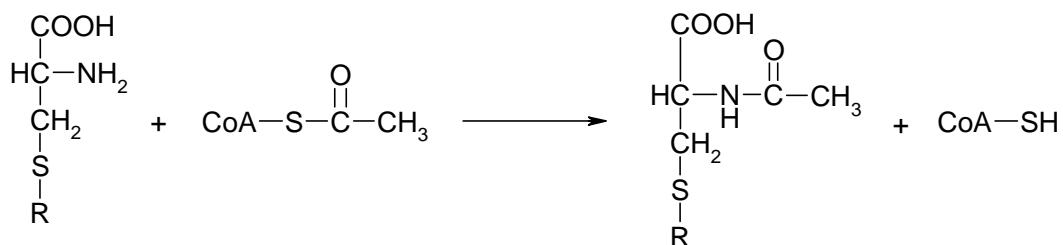


Abb. 2-9: Durch Cystein-S-Konjugat-spezifische *N*-Acetyl-S-Transferase katalysierte Übertragung einer Acetyl-Gruppe auf Cystein-S-Konjugate.

Das membrangebundene Enzym unterscheidet sich von anderen cytosolischen *N*-Acetyltransferasen, die ebenfalls bei der Entgiftung von Xenobiotika eine Rolle spielen. Arylamin-*N*-Acetyltransferasen (EC 2.3.1.5) katalysieren die Acetylierung von primären Arylaminen, Hydrazinen und weiteren Verbindungen in der Leber [Heim et al., 1991]. Diese *N*-Acetyltransferasen verfügen auch über eine *N*-Hydroxylamin-O-Acetyltransferase- und eine Arylhydroxamsäure-*N,O*-Acyltransferase-Aktivität [Saito et al., 1986; Mattano et al., 1989; Ilett et al., 1991].

Weiterhin zeichnet sich die Cystein-S-Konjugat-spezifische *N*-Acetyl-S-Transferase durch eine hohe Substratspezifität aus, welche ebenfalls eine Unterscheidung von anderen Acetyltransferasen ermöglicht [Green und Elce, 1975]. So akzeptiert das

Enzym ausschließlich S-substituierte L-Cysteine bzw. deren Serinanaloga. Unsubstituierte Aminosäuren wie L-Cystein, L-Methionin, L-Serin, L-Phenylalanin und L-Glutaminsäure sind keine Substrate für das Enzym. Der  $K_m$ -Wert sinkt mit steigender Lipophilie des Substrates. Die katalytische Effizienz, ausgedrückt durch den Quotienten  $V_{max} / K_m$ , korreliert mit der Hansch  $\pi$ -Konstanten [Duffel und Jakoby, 1982].

Durch Messung einer Michaelis-Menten-Kinetik konnte für das mikrosomale Enzym ein  $K_m$ -Wert von 77,2  $\mu$ M (Modellsubstrat S-(4-Nitrobenzyl)-L-cystein) und die Maximalgeschwindigkeit  $V_{max}$  zu 4,26 nmol/h bestimmt werden [Aigner, 1995]. Die Molmasse der N-Acetyl-S-Transferase wurde mit Gelpermeationschromatographie zu 34 kDa bestimmt [Aigner, 1995].

Die Teilreinigung des Enzyms erfolgte über die Solubilisierung aus Mikrosomen mit Hilfe des Detergens DesoxyBIGCHAP, Polyethylenglykolfällung, anschließender DEAE-Anionenaustauschchromatographie und FPLC-Mono Q-Anionenaustauschchromatographie. Durch diese Teilreinigung konnte das Enzym um den Faktor 6,8 angereichert werden.

## 2.6 Aufgabenstellung

Aus früheren Untersuchungen [Green und Elce, 1975] wurde abgeleitet, daß die Cystein-S-Konjugat-spezifische N-Acetyl-S-Transferase an der Entgiftung von lipophilen Xenobiotika beteiligt ist und den letzten Schritt des Mercaptursäureweges katalysiert. Aufgrund der Substratspezifität und der Lokalisation des Enzyms in der Membran des endoplasmatischen Reticulums unterscheidet es sich von anderen N-Acetyltransferasen, so daß es als Markerenzym für den Mercaptursäureweg betrachtet werden kann. In Leber und Niere ist dieser Stoffwechselweg bereits nachgewiesen worden. Die Cystein-S-Konjugat-spezifische N-Acetyl-S-Transferase stellt ein repräsentatives Enzym des Mercaptursäureweges dar und ist Gegenstand dieser Arbeit.

Die Ausschleusung der Mercaptursäuren hängt nicht nur von der N-Acetyl-S-Transferase-Aktivität ab, sondern wird durch ein empfindliches Zusammenspiel von konkurrierenden Enzymen beeinflusst. Dieses Zusammenspiel ist abhängig von dem Gleichgewicht der Acetylierung und Desacetylierung, weiterhin von der Zugänglichkeit der Cystein-S-Konjugate für den Thiomethyl-Shunt. Von diesem Zusammenspiel hängt es ab, ob und wie stark ein lipophiles Xenobiotikum toxisch wirkt.

Um einen Zusammenhang zwischen der Struktur eines Haloalkans bzw. Haloalkens und dessen Nephrotoxizität herstellen zu können, sind die kinetischen Größen  $K_m$  und  $V_{max}$  der Acetylierung der entsprechenden Cystein-S-Konjugate von Interesse.

Für die Teilreinigung der N-Acetyl-S-Transferase war bereits ein Verfahren etabliert worden, das jedoch nicht in bezug auf die in der Kinetik störend auswirkenden Enzyme Desacetylase und Acetyl-CoA-Hydrolase optimiert war. Weiterhin waren spezifische Phagenklone vorhanden, die mit gegen N-Acetyl-S-Transferase gerichteten Antikörpern aus einer cDNA-Expressionsbank (Leber) isoliert waren [Aigner, 1995].

Die Aufgabenstellung dieser Arbeit umfaßte:

- Überprüfung von alternativen Reinigungsstrategien für das etablierte Teilreinigungsverfahren bzw. Optimierung des etablierten Reinigungsverfahrens. Insbesondere sollte das krebserregende Detergens DesoxyBIGCHAP durch ein geeignetes Detergens ersetzt werden.
- Etablierung von Aktivitätstests für die konkurrierenden Enzyme Desacetylase (Aminoacylase) und Acetyl-CoA-Hydrolase.
- Etablierung eines quantitativen radioaktiven Aktivitätstests für verschiedene Haloalkyl- und Haloalkenyl-Cystein-S-Konjugate (freundlicherweise von Dr. M. W. Anders, Rochester, NY zur Verfügung gestellt).
- Bestimmung der kinetischen Parameter  $K_m$  und  $V_{max}$  für verschiedene Haloalkyl- und Haloalkenyl-Cystein-S-Konjugate.
- Isolierung und Sequenzierung von cDNA-Insertionen aus spezifischen Phagenklonen.



### 3. Materialien

#### 3.1 Allgemeine Laborchemikalien

Aceton	Merck, Darmstadt
Acetonitril	Baker, Deventer, NL
Acetyl-Coenzym A, Lithiumsalz	Sigma, Deisenhofen
<i>N</i> -Acetyl-S -(4-nitrobenzyl)-L-cystein	Eigene Synthese
Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agarose	Sigma, Deisenhofen
$\epsilon$ -Aminocaprinsäure	Janssen Chimica, Geel, B
Ammoniumperoxodisulfat	Roth, Karlsruhe
Ammoniumsulfat	AppliChem, Darmstadt
Ampholyte	Serva, Heidelberg
Bisacrylamid	Serva, Heidelberg
<i>N,N</i> -Bis(3-D-glucoamidopropyl)-desoxycholin	Eigene Synthese
Borsäure	Roth, Karlsruhe
5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Fluka, Neu-Ulm
3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonium]- 1-propan-sulfonat	AppliChem, Darmstadt
Coenzym A	Sigma, Deisenhofen
Coomassie Brilliant Blau G250/R250	Fluka, Neu-Ulm
Cystein-S -Konjugate	Dr. M. W. Anders, Rochester, USA
Dimethylsulfoxid	Fluka, Neu-Ulm
Dithiothreitol	AppliChem, Darmstadt
<i>N,N</i> -Dimethylformamid	Fluka, Neu-Ulm
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Ethylendiamin- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol, p.a.	AppliChem, Darmstadt
Formaldehyd, 37 % (v/v)	AppliChem, Darmstadt
Glycerin	Biomol, Ilvesheim
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe
Kaliumcarbonat	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogensulfat	Roth, Karlsruhe

Magermilchpulver	Fluka, Neu-Ulm
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
$\beta$ -Mercaptoethanol	Fluka, Neu-Ulm
Methanol, HPLC-grade	Baker, Deventer, NL
Methanol, p.a.	AppliChem, Darmstadt
Natriumchlorid	AppliChem, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat	Sigma, Deisenhofen
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Natriumthiosulfat	Roth, Karlsruhe
Nichtdetergente Sulfobetaine	Dr. Vuillard, Grenoble
4-Nitro-S -benzyl-L-cystein	Eigene Synthese
Nitro Blue Tetrazolium	Sigma, Deisenhofen
Nonidet P-40	Fluka, Neu-Ulm
n-Propanol	Merck, Darmstadt
Phosphorsäure, 85 % (v/v)	Merck, Darmstadt
Polyethylenglykol 6000	Merck, Darmstadt
Ponceau S	Sigma, Deisenhofen
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Salzsäure, 36 % (v/v)	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure, 98 % (v/v)	Merck, Darmstadt
Serdolit MB-1	Serva, Heidelberg
Silbernitrat	Merck, Darmstadt
<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin	AppliChem, Darmstadt
Trichloressigsäure	AppliChem, Darmstadt
Trifluoressigsäure	AppliChem, Darmstadt
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	ICN Biomedicals, Aurora, USA
Triton X-100	Fluka, Neu-Ulm
Triton X-114	Sigma, Deisenhofen
Tween 20	Fluka, Neu-Ulm
Tween 80	Fluka, Neu-Ulm
Wasserstoffperoxid, 30 % (v/v)	Merck, Darmstadt

### 3.2 Laborgeräte

Autoklav "Sanoclav"	Wolf, Geislingen
Diffusionsentfärbeapparatur	DESAGA, Heidelberg
Druckfiltrationszellen	Amicon, Beverly, USA
Elektrophoreseapparaturen	
Proteine: Vertikale Flachgele	Werkstatt, TU Darmstadt
Röhrchengele	BioRad, München
DNA: Flachbettgele	Werkstatt, TU Darmstadt
Macrophor Vertikalapparatur	LKB, München
Exponierbox mit Verstärkerfolie	Kodak, GB
FPLC-Anlage	Pharmacia, Freiburg

Fraktionssammler	LKB, München
Geltrockner Slab Gel Dryer 2003	LKB, München
Hochvakuumpumpe	Edwards, Frankfurt/Main
Homogenisatoren	
Dounce-Glasschliff-Homogenisator	Braun, Hamburg
Potter-Elvehjem-Homogenisator	Janke & Kunkel, Staufen
Ultra-Turrax	Janke & Kunkel, Staufen
HPLC-Anlage System Gold	Beckman, München
Steuereinheit: IBM PS/2	IBM, Stuttgart
pH-Meßgerät	Janke & Kunkel, Staufen
Kühleinheit 2219 Multitemp II	LKB, München
Rotationsverdampfer Rotavapor-EL	Büchi, Flawil, CH
Rotoren	
GSA, GS3, SS34	Sorvall DuPont
SW28	Beckmann, München
Spannungsgeräte	
Niederspannung	Elvi, Mailand, I
Hochspannung	LKB, München
Speed-Vac Univapo 150 H	Uniequip, Martinsried
Spektralphotometer	
Single Path Monitor UV-1	Pharmacia, Freiburg
U-1100	Hitachi, Japan
DU 70	Beckman, München
Thermocycler 60	Biomed,
Szintillationszähler Minaxiþ Tri-Carb 4000	Hewlett Packard
UV-Transilluminator	Vetter
Western Blot-App. Trans-Blot Semi-Dry	BioRad, München
Zentrifugen	
Beckman L5-50, L8-55 M Ultrazentrifugen	Beckman, München
Labofuge GL	Heraeus Christ,
	Osterode
Mikroliter Tischzentrifuge	Hettich, Tuttlingen
Sorvall RC5C	Sorvall DuPont

### 3.3 Bakterienstämme

<i>E.coli</i> XL 1-Blue	Stratagene, La Jolla, USA
Genotyp: <i>end</i> A1, <i>hsd</i> R17 ( $r_k^-$ , $m_k^+$ ), <i>sup</i> E44, <i>thi</i> -1, <i>rec</i> A1, <i>gyr</i> A96, <i>rel</i> A1, <i>lac</i> $^-$ , [F' <i>lacI</i> <sup>q</sup> $\Delta$ M15, <i>pro</i> AB, Tn10 ( <i>tet</i> <sup>r</sup> )]	
<i>E.coli</i> Y1090r $^-$	Clonotech, Palo Alto, USA
Genotyp: <i>ara</i> D139, <i>hsd</i> R ( $r_k^-$ , $m_k^+$ ), <i>mcrA</i> $^-$ , <i>rps</i> L ( <i>str</i> <sup>r</sup> ), <i>sup</i> F, <i>trp</i> C22::Tn10 ( <i>tet</i> <sup>r</sup> , $\Delta$ <i>lac</i> U169, $\Delta$ <i>lon</i> , (pMC9( <i>tet</i> <sup>r</sup> u. <i>amp</i> <sup>r</sup> ))	

### 3.4 Plasmide und Bakteriophagen

pBluescript SK(-)

Stratagene,  
La Jolla, USA $\lambda$ -Zap IIStratagene,  
La Jolla, USA

Genotyp:  $\lambda$ chi A131, *sbh*  $\lambda$ 1°, [ $\Delta$ (*sm*  $\lambda$ 1-*shn*  $\lambda$ 3):pPreB and pUC19 polylinker  
*Xba* I to *Hin* dIII], *cl*857, *sr*  $\lambda$ 4°, *nin* 5, *sr*  $\lambda$ 5°, Sam100

### 3.5 Nukleotide und Oligonukleotide

Zur Sequenzierung von rekombinanter DNA wurden Primer in einer Konzentration von 10 pmol/ $\mu$ l eingesetzt. Die Primer wurden von der Firma Applied Biosystems, Weiterstadt synthetisiert.

<i>TKA91</i>	5'-TGG ACA AAC TTC GTC ACT T-3'
<i>TKA91r</i>	5'-GCT GTC ATG GAC GAA GC-3'
<i>TKA92</i>	5'-GAA TCA AAT CAA TTC CCG A-3'
<i>TKA92r</i>	5'-CCG TCC TAT AGT TGC TA-3'
<i>TKA93</i>	5'-ATT CAC AAT ACG GGT GTC-3'
<i>TKA93r</i>	5'-TTG TTA TTC ACA ATA CGG G-3'
<i>TKA94</i>	5'-TTG GGT CTG TCC CAA C-3'
<i>TKA94r</i>	5'-AAG GAT GTC GTG GCG T-3'
<i>TKA95</i>	5'-CTA GTT CAC AGC ACC CA-3'
<i>TKA95r</i>	5'-TGG TTG AAT CAA AGT GAT-3'
<i>TKC201</i>	5'-CTT GTA CGT TGG CGG G-3'
<i>TKC201r</i>	5'-TGC GAA CGG ATC GGC A-3'
<i>TKE17</i>	5'-AAC AGC AGA TAA ACA AGC-3'
<i>TKEGH31</i>	5'-CCT GGC TAT CTT CTG TG-3'
<i>TKG1</i>	5'-CTG GGA ACA GAA TCC TG-3'
<i>TKG1r</i>	5'-CTT CTG GTT TTC AAA GCC C-3'
<i>TKG2</i>	5'-GTG AGT TCT ATA CGC CAC-3'
<i>TKG2r</i>	5'-GTC ATC TTC TCG ATT ATC G-3'
<i>TKG3</i>	5'-GAA TGA TGG TGT TCG TGG-3'
<i>TKG3r</i>	5'-CCA TGG CTG GGT CAT AG-3'
<i>TKG4</i>	5'-GGA TGG CGA TTG TTT TGC-3'
<i>TKG4r</i>	5'-GAT CCA CGT TAT GGC TG-3'
<i>TKGH1</i>	5'-TGG ATA ACA CGG CGC TG-3'
<i>TKH151</i>	5'-AGT GGA TAA CAC GGC GC-3'
<i>T3</i>	5'-ATT TAA CCC TCA CTA AAG GG-3'
<i>T7</i>	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'
<i>M13(-20)</i>	5'-GTA AAA CGA CGG CCA GT-3'
<i>M13 reverse</i>	5'-AAC AGC TAT GAC CAT G-3'

Desoxynukleotide  
 Heringssperma DNA

Biolabs, USA  
 Boehringer, Mannheim

### 3.6 Radiochemikalien

[<sup>14</sup>C] Acetyl-CoA

NEN DuPont, Neu-Isenburg

[α-<sup>35</sup>S] dATP

NEN DuPont, Neu-Isenburg

### 3.7 Größenstandards

#### Protein-Molekulargewicht-Standard

SDS-7 Marker (Sigma, Deisenhofen)	Komponente	Molmasse [kDa]
	Rinderserumalbumin	66
	Ovalbumin	45
	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	36
	Carboanhydrase aus Rindererythrocyten	29
	Trypsinogen aus Rinderpankreas	24
	Trypsin-Inhibitor aus Sojabohne	20
	α-Lactalbumin aus Rindermilch	14,2

#### DNA-Basenpaarstandard

λ-DNA fragmentiert mit *Hin* dIII und *Eco* RI ergibt folgende DNA-Fragmente (in [bp]) [Boehringer, Mannheim]:

21.226		1.584
5.148		1.375
4.973		947
4.268		831
3.530		564
2.027		125
1.904		

### 3.8 Enzyme

Restriktionsendonukleasen:

*Eco* RI

Gibco BRL, Eggenstein

*Hin* dIII

Gibco BRL, Eggenstein

*Sal* I

Gibco BRL, Eggenstein

DNA-modifizierende Enzyme:

Alkalische Phosphatase

Gibco BRL, Eggenstein

T4 DNA-Ligase

Pharmacia, Freiburg

**Sonstige Enzyme:**

Lysozym

Phospholipase C

RNase A

*Taq* -DNA-Polymerase

Sigma, Deisenhofen

Sigma, Deisenhofen

Sigma, Deisenhofen

Gibco BRL, Eggenstein

**3.9 Säulenmaterialien**

Affi-Gel blue

Amberlite MB1

DEAE-Affi-Gel blue

DEAE-Cellulose DE-52

MacroPrep 50Q

Mono Q HR 5/5

Nucleosil 120-5 C18 (HPLC)

Phenyl-Sepharose

Qiagen-tip 100

Resource Q

Serdolite

Pharmacia, Freiburg

Serva, Heidelberg

BioRad, München

Whatman,

Maidstone, GB

BioRad, München

Pharmacia, Freiburg

Machery &amp; Nagel, Düren

Pharmacia, Freiburg

Qiagen, Hilden

Pharmacia, Freiburg

Serva, Heidelberg

**3.10 Sonstige Materialien**

3MM-Papier

Centricon Ultrakonzentratoren

DNA-Sequenzierkit

Druckdialysemembranen

Einmal-Sterilfilter

Filtermembranen

Filterpapiere

Kieselgel 60 DC-Aluminiumfolien

Molekularsiebmaterial

Nitrocellulosemembran, 0,2 µm

Polaroid-Filme

PVDF-Membran, 0,2 µm

Reinigungskit für DNA

Röntgenfilme

Silane, Repel-, Binde-

Stickstoff (flüssig)

Whatman,

Maidstone, GB

Amicon, Beverly, USA

Pharmacia, Freiburg

Amicon, Beverly, USA

Schleicher &amp; Schuell,

Dassel

Millipore, Eschborn

Schleicher &amp; Schuell,

Dassel

Merck, Darmstadt

Roth, Karlsruhe

Schleicher &amp; Schüll,

Dassel

Polaroid, Offenbach

BioRad, München

Qiagen, Hilden

Kodak, GB

LKB, München

Linde, Wiesbaden

## 4. Methoden

### 4.1 Chemische Synthesen

#### 4.1.1 Synthese von **S**-(4-Nitrobenzyl)-L-cystein

[Modifiziert, Bachi u. Ross-Petersen, 1972]

Unter Stickstoffatmosphäre wurden auf Eis 10 mmol (1,75 g) L-Cystein-Hydrochlorid in 30 ml 1 M Natriumhydroxidlösung gelöst. 10 mmol (1,75 g) 4-Nitrobenzylchlorid, in 15 ml Dioxan gelöst, wurden langsam unter Rühren zu der vorgelegten Lösung von L-Cystein-Hydrochlorid getropft. Im Anschluß wurde das Reaktionsgemisch 30 Minuten auf Eis und nochmals 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Der Reaktionsansatz wurde zweimal mit je 100 ml Diethylether gewaschen. Mit konz. Salzsäure wurde pH 4 eingestellt und der ausfallende Niederschlag wurde über einer Nutsche abgetrennt. Der beige farbige Niederschlag wurde je einmal mit 30 ml Wasser, 30 ml Ethanol und 30 ml Diethylether gewaschen.

Die Reinheit des Produktes wurde dünnschichtchromatographisch (stationäre Phase: Kieselgel 60 auf Aluminium, mobile Phase: n-Butanol/Essigsäure/Wasser, 2:1:1) überprüft.

#### 4.1.2 Synthese von **N**-Acetyl-**S**-(4-nitrobenzyl)-L-cystein

[du Vigeaud u. Meyer, 1932]

1 mmol (0,3 g) **S**-(4-Nitrobenzyl)-L-cystein wurden in 30 ml Eisessig suspendiert und mit 1 mmol (0,1 g) Acetanhydrid versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 1 Stunde auf 100°C unter Rückfluß und Rühren im Wasserbad erwärmt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Hochvakuum entfernt.

Das zurückbleibende orange-rote Rohprodukt wurde bei 65°C in 80 ml 0,5 M Essigsäure gelöst und nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur über Kationenaustauschchromatographie gereinigt. Dazu wurde eine Whatman CM-52 Cellulose-Säule (Säulenbettvolumen 10 ml) mit 50 ml 0,5 M Essigsäure äquilibriert und anschließend das gelöste Rohprodukt aufgegeben. Mit 300 ml 0,5 M Essigsäure wurde eluiert, die nichtbindende Fraktion gesammelt und das Lösungsmittel im Hochvakuum abgezogen.

#### 4.1.3 Synthese von **N,N'**-Bis-(3-D-gluconamidopropyl)-desoxycholid („Desoxy-BIGCHAP“)

[Modifiziert, Hjelmeland et al. 1983]

200 mmol (26 g) Iminobispropylamin wurden in 800 ml Methanol, getrocknet über einem Molekularsieb (3 Å), gelöst und auf 80°C im Wasserbad unter Rückfluß erwärmt. 400 mmol (71 g) Glucono- $\delta$ -lacton wurden langsam hinzugegeben und der Reaktionsansatz wurde 4 Stunden bei 80°C unter Rückfluß erwärmt. Anschließend wurde der Ansatz auf Eis 1 Stunde gekühlt, wobei ein weißer Niederschlag von **N,N'**-[Iminobis(trimethylen)]-bis-[D-gluconamid] entsteht. Der Niederschlag wurde vor der Weiterverarbeitung an der Luft getrocknet und bei 4°C aufbewahrt.

200 mmol (78 g) Desoxycholsäure wurden in 1 l DMF (über Molekularsieb 4 Å getrocknet) gelöst. Zu der Lösung wurden langsam 200 mmol (28 ml) Triethylamin gegeben. Das Gemisch wurde auf Eis abgekühlt und dann wurden rasch 200 mmol (20 g) Isobutylchloroformiat hinzugegeben. Dabei fiel ein feiner Niederschlag von Triethylamin-hydrochlorid aus. Der Niederschlag wurde über einen Membranfilter (0,45 µm) abgetrennt und das verbleibende klare, gelbe, gemischte Anhydrid wurde bis zur Weiterverarbeitung auf Eis aufbewahrt.

Die gesamte Menge *N,N*-[Iminobis(trimethylen)]-bis-[D-gluconamid] wurde unter Erwärmen auf 60°C in 700 ml DMF (getrocknet über Molekularsieb, 4 Å) gelöst und anschließend auf Eis abgekühlt. Beim Auftreten einer leichten Trübung wurde die Lösung des gemischten Anhydrids zugegeben und der Ansatz wurde 24 Stunden unter Rühren bei 4°C stehen gelassen. Das DMF wurde im Hochvakuum abgezogen und der gelbe Rückstand wurde in mehreren Ansätzen mit insgesamt 1 l Methanol (getrocknet) extrahiert. Die erhaltene viskose, milchige Flüssigkeit wurde filtriert. Im Anschluß an die Filtration wurde das Methanol im Hochvakuum abgezogen. Der gelbe Rückstand wurde in 300 ml Aceton (getrocknet) zerstoßen und das Aceton wurde im Hochvakuum abgetrennt.

Zur weiteren Reinigung des Rohproduktes wurde mehrmals aus insgesamt 1,5 l kochendem Isopropanol umkristallisiert. Die so erhaltenen Kristalle wurden in Methanol (getrocknet) gelöst, die Lösung wurde filtriert und anschließend auf eine Ionenaustauschsäule (Serdolit Amberlite MB-1, Säulenbettvolumen 250 ml), äquilibriert mit Methanol, gegeben und mit Methanol eluiert. Die nichtbindende Fraktion wurde gesammelt und das Methanol wurde im Hochvakuum abgezogen. Zurück blieben gelbe Kristalle, welche im Exsikkator aufbewahrt wurden.

Die Reinheit des Produktes wurde dünnschichtchromatographisch untersucht. Dazu wurden 2 µl in Wasser gelöstes Produkt auf eine Kieselgel 60 DC-Aluminiumplatte aufgetragen und getrocknet. Als mobile Phase wurde n-Butanol/Wasser/Essigsäure 3:1:1 verwendet. Nach dem Trocknen wurde die DC-Platte mit konz. Schwefelsäure besprüht und bis zur gewünschten Färbung bei 180°C inkubiert.

## 4.2 Proteinchemische Methoden

### 4.2.1 Enzymaktivitätstests

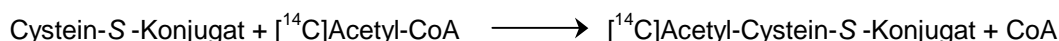
Zum Nachweis der Aktivität von Enzymen werden häufig Modellsubstrate eingesetzt. Die Umsetzung beruht oft auf der Abspaltung oder Übertragung von funktionellen Gruppen bei diesen Substraten, katalysiert durch das Enzym. Die Zunahme des Produktes oder die Abnahme des Substrates kann dann über spektroskopische oder radioaktive Methoden quantifiziert und verfolgt werden.

#### 4.2.1.1 Radioaktive Bestimmung der Aktivität der *N*-Acetyl-S-Transferase

Um kinetische Konstanten von unterschiedlichen L-Cystein-S-Konjugaten zu bestimmen, wurde der bereits beschriebene radioaktive Aktivitätstest für die *N*-Acetyl-S-Transferase [Aigner et al., 1994] modifiziert.



Die Umsetzung beruht auf der Übertragung einer [ $^{14}\text{C}$ ]-Acetyl-Gruppe von radioaktiv markiertem Acetyl-CoA auf ein L-Cystein-S -Konjugat:



Das Reaktionsgemisch setzte sich wie folgt zusammen:

- 14,4  $\mu\text{l}$  Enzymfraktion
- 2,4  $\mu\text{l}$  1 mM Kaliumphosphat, pH 7,0
- 6  $\mu\text{l}$  3,15 mM radioaktives Acetyl-CoA-Mix  
(enthält 157,5 nmol/ml [ $^{14}\text{C}$ ]Acetyl-CoA, spez. Aktivität 55  $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ )
- 2  $\mu\text{l}$  L-Cystein-S -Konjugate in verschiedenen Konzentrationen  
(s. Tabelle 4-1)

Eingesetzt wurden folgende L-Cystein-S -Konjugate (freundlicherweise von Prof. Dr. M. W. Anders, Rochester NY, zur Verfügung gestellt):

Tab. 4-1: Verwendete L-Cystein-S -Konjugate.

Nr.	Substrat	Abkürzung	Eingesetzte Konzentration [ $\mu\text{M}$ ]
<b>1a</b>	S -(1,1,2,2-Tetrafluorethyl)-L-cystein	TFEC	20 bis 1000
<b>1b</b>	S -(2-Chlor-1,1,2-trifluorethyl)-L-cystein	CTFC	20 bis 1000
<b>1c</b>	S -(2-Brom-1,1,2-trifluorethyl)-L-cystein	BTFC	20 bis 1000
<b>1d</b>	S -(2,2-Dibrom-1,1-difluorethyl)-L-cystein	DBDFC	10 bis 1000
<b>1e</b>	S -[2-(Fluormethoxy)-1,1,3,3,3-pentafluorpropyl]-L-cystein	compdAlkan	20 bis 1000
<b>2a</b>	S -(1,2,3,4,4-Pentachlor-1,3-butadienyl)-L-cystein	PCBC	5 bis 600
<b>2b</b>	S -(1,2-Dichlorvinyl)-L-cystein	DCVC	20 bis 1000
<b>2c</b>	S -[2-(Fluormethoxy)-1,3,3,3-tetrafluor-1-propenyl]-L-cystein	compdAlken	1000

Der Testansatz wurde bei 37°C für 30 Sekunden bis zu 60 Minuten (abhängig vom jeweils eingesetzten Substrat) im Wasserbad erwärmt und anschließend zum Abstoppen der Reaktion 1 Minute auf 100°C erhitzt. Die denaturierten Proteine wurden auf Eis 2 Minuten ausgefällt und durch Zentrifugation (30 Minuten, 13.800  $\times$  g) abgetrennt. 5  $\mu\text{l}$  des Überstandes wurden auf eine Kieselgel 60 DC-Aluminiumfolie aufgetragen und mit Isoamylalkohol/Essigsäure/Wasser 3:2:1 als mobile Phase aufgetrennt. Nach dem Trocknen der Folien unter Rotlicht wurde die Radioaktivität über Exposition eines Röntgenfilms (bis zu einem Monat lang, abhängig vom Substrat) detektiert. Der exponierte Röntgenfilm wurde nach dem Entwickeln gescannt (Mustek SP6 II) und mit Hilfe der Software Scion-Image (Scion) densitometrisch ausgewertet.

#### 4.2.1.2 Nichtradioaktive Bestimmung der Aktivität der *N*-Acetyl-S-Transferase [Jäger, 1993; Aigner et al., 1994]

Um die spezifische Aktivität der *N*-Acetyl-S-Transferase in partiell gereinigten Enzymfraktionen zu bestimmen, wurde das Substrat 4-Nitro-S-benzyl-L-cystein eingesetzt. Der Test beruht auf der Übertragung einer Acetyl-Gruppe auf das Substrat und der Umkehrphasen-HPLC gestützten Detektion des Produktes *N*-Acetyl-(4-nitro-S-benzyl)-L-cystein bei 280 nm.

Der Testansatz setzt sich wie folgt zusammen:

9 µl	1 M Kaliumphosphat, pH 7,0
15 µl	4,8 mM S-(4-Nitrobenzyl)-L-cystein
9,6 µl	10 mM Acetyl-CoA
26,4 µl	Enzymfraktion

Der Testansatz wurde - abhängig von der eingesetzten Enzymfraktion - von einer Minute bis zu einer Stunde bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Erhitzen des Ansatzes auf 100°C für eine Minute abgestoppt, und die denaturierten Proteine durch zweiminütige Inkubation des Ansatzes auf Eis ausgefällt. Durch Zentrifugation (30 Minuten, 13.800 × g) wurden die ausgefällten Proteine abgetrennt. 50 µl des Überstandes wurden für die HPLC-Analyse abgezogen.

Die Analyse der Proben erfolgte mittels Umkehrphasen-Hochdruckflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC). Die Steuerung der HPLC-Anlage und die Auswertung erfolgte mit Hilfe der „System Gold“-Software der Firma Beckman. Das Probenauftragsvolumen betrug 25 µl, bei wiederholtem Auftrag 20 µl. Es wurde eine Nucleosil 120-5 C<sub>18</sub>-Säule (4 x 210 mm) mit identisch gefüllter Vorsäule eingesetzt. Als mobile Phase wurde 0,1 % (v/v) TFA und 100 % Acetonitril verwendet.

Es wurde nach folgendem Programm eluiert:

Zeit [min]	c <sub>Acetonitril</sub> [Vol. %]	Funktion
0	20	Beginn des Laufs
1	20	Probenauftragsventil öffnen
1,5	20	Probenauftragsventil schließen
2	20	Beginn des aufsteigenden Gradienten
12	40	
15	90	Ende des aufsteigenden Gradienten
20	90	Ende des Plateaus
25	20	Äquilibration für neuen Lauf
30	20	Ende des Laufs

Die Volumenaktivität errechnete sich nach folgender Formel:

$$\text{Vol.Akt.} = \frac{A_{\text{Signal}}}{6} \cdot \frac{1000}{V_{\text{Probe}}} \cdot \frac{V_{\text{ges}}}{V_{\text{Injektion}}} \cdot \frac{1}{t}$$

Vol.Akt.	Volumenaktivität [U/ml]
$A_{\text{Signal}}$	Signalfläche
6	Eichfaktor, 6 FE = 1 nmol
$V_{\text{Probe}}$	Probenvolumen [ $\mu\text{l}$ ]
$V_{\text{ges}}$	Volumen des Ansatzes (60 $\mu\text{l}$ )
$V_{\text{Injektion}}$	Auftragsvolumen [ $\mu\text{l}$ ]
t	Inkubationszeit [min]
1000	Umrechnungsfaktor ( $\mu\text{l} \rightarrow \text{ml}$ )

Eine Einheit [U] entspricht definitionsgemäß der Menge Enzym, die unter Testbedingungen für die Bildung von 1 nmol Produkt pro Minute erforderlich ist [Duffel und Jakoby, 1985].

#### 4.2.1.3 Bestimmung der Aktivität der Desacetylase

Zur Bestimmung der Desacetylase-Aktivität der Enzymfraktionen wurde anstatt S-(4-Nitrobenzyl)-L-cystein das acetylierte Produkt N-Acetyl-S-(4-nitrobenzyl)-L-cystein in den unter 4.2.1.2 beschriebenen Test eingesetzt. Zur Quantifizierung der Desacetylase-Aktivität wurde eine Eichreihe aufgenommen, aus der die Menge an gebildetem S-(4-Nitrobenzyl)-L-cystein abgelesen werden konnte.

Eine Einheit [U] entspricht der Menge an Enzym, welche für die Bildung von 1 nmol Produkt pro Minute unter Testbedingungen erforderlich ist.

#### 4.2.1.4 Bestimmung der Aktivität der Acetyl-CoA-Hydrolase

Der Test beruht auf der Hydrolyse von Acetyl-CoA. Um die Aktivität der Acetyl-CoA-Hydrolase zu bestimmen, wurde der unter 4.2.1.2 beschriebene Test leicht modifiziert.

Der Testansatz setzte sich wie folgt zusammen:

26,4 $\mu\text{l}$	Enzymfraktion
9 $\mu\text{l}$	1 M Kaliumphosphat, pH 7
9,6 $\mu\text{l}$	10 mM Acetyl-CoA
15 $\mu\text{l}$	Wasser

Der Testansatz wurde 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurde der Ansatz 1 Minute auf 100°C im Wasserbad erhitzt und zum Fällern der denaturierten Proteine wurde 2 min auf Eis inkubiert. Die ausgefällten Proteine wurden durch Zentrifugation (13800  $\times$  g, 30 Minuten) sedimentiert und 25  $\mu\text{l}$  des Überstandes

wurden zur RP-HPLC gestützten Auswertung abgezogen. Verwendet wurde eine HPLC-Anlage von Beckman mit der Steuer- und Analysensoftware „System Gold“. Die Trennung erfolgte über eine Nucleosil 120-5 C<sub>18</sub>-Säule mit Acetonitril („Lösung A“) und 17,5 % (v/v) Methanol mit 50 mM Kaliumphosphat, pH 4 als Elutionsmittel („Puffer B“).

Eluiert wurde nach folgendem Programm:

Zeit [min]	% Puffer B	Funktion
0	5	Beginn des Laufs
1	5	Probenauftragsventil öffnen
1,5	5	Probenauftragsventil schließen
2	5	Beginn des aufsteigenden Gradienten
15	40	Ende des aufsteigenden Gradienten
17	40	Ende des Plateaus
19	80	Regenerierung der Säule
21	5	Äquilibration für neuen Lauf
25	5	Ende des Laufs

Die Auswertung erfolgte über eine Eichgerade, aus der die gebildete Menge an CoA abgelesen werden konnte.

Eine Einheit [U] entspricht der Menge an Enzym, welche zur Bildung von 1 nmol Produkt pro Minute unter Testbedingungen erforderlich ist.

#### 4.2.2 Proteinbestimmung

##### 4.2.2.1 Absorptionsmessung bei 280 nm

[Layne, 1957; Peterson, 1983]

Aufgrund des Gehaltes an den aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin in Proteinen läßt sich die Konzentration von Proteinen in Gemischen schnell und einfach über Absorptionsmessung bei 280 nm bestimmen. Die Absorption ist aufgrund des Lambert-Beerschen-Gesetzes proportional zur Konzentration der gelösten Proteine, so daß trotz unterschiedlichen Gehaltes der Proteine an aromatischen Aminosäuren folgende Näherung gilt:

$$1 \times E_{280} \approx 1,0 \text{ mg/ml}$$

Die Messung der Absorption von Proteinlösungen erfolgte in Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm. Die Lösungen wurden so verdünnt, daß die Meßwerte zwischen 0,1 und 1 lagen. Als Referenz wurde der entsprechende Puffer eingesetzt.

##### 4.2.2.2 Proteinbestimmung durch Totalhydrolyse

Ca. 20 µg (bestimmt über Absorptionsmessung bei 280 nm, s. 4.2.2.1) wurden in ein Hydrolyseröhrchen vorgelegt und gefriergetrocknet. Der Rückstand wurde in 200 µl 6 M HCl aufgenommen, mit Stickstoff überschichtet und das Röhrchen wurde gasdicht verschlossen. Anschließend wurden die Proteine durch Erhitzen des Röhrchen für

24 Stunden bei 108°C zu Aminosäuren hydrolysiert. Um die Salzsäure zu entfernen, wurde diese im Stickstoffstrom abgeblasen.

Zur Analyse der Zusammensetzung des Hydrolysats, wurde das Hydrolysat über eine Kationenaustauschsäule an einer HPLC-Anlage getrennt und durch Nachsäulenderivatisierung mit Ninhydrin wurden die einzelnen Aminosäuren photometrisch bei 570 nm detektiert (440 nm für die Iminosäure Prolin). Die erhaltenen Signalfächen für die einzelnen Aminosäuren ließen direkt auf die Konzentration der Aminosäuren schließen.

Die Proteinbestimmung durch Totalhydrolyse wurde freundlicherweise von Frau Moldehn, TU Darmstadt durchgeführt.

### **4.2.3 Konzentrierung oder Umpuffern von Proteinlösungen**

#### **4.2.3.1 Druckdialyse mit Amicon-Zellen**

Um größere Volumina (bis zu 300 ml) einzuengen oder umzupuffern, wurde die Proteinlösung durch Stickstoff-Überdruck von 3 bar bei 4°C durch eine semipermeable Membran (YM 10, Ausschlußmolekulargewicht 10 kDa) gepreßt. Der Zusammenbau der Apparatur erfolgte nach Herstellerangaben. Die so erhaltenen Volumina der Lösungen betrugen ca. 5 ml.

#### **4.2.3.2 Konzentrierung durch Zentrifugation in Centricon Ultrakonzentratoren**

Um kleinere Volumina (pro Röhrchen maximal 2,5 ml) zu konzentrieren, wurden Centricon-Röhrchen eingesetzt. Bei dieser Methode wurden die Lösungen durch Zentrifugalkraft durch semipermeable Membranen mit einem Ausschlußmolekulargewicht von 10 kDa gepreßt. Die Zentrifugation wurde mit  $3000 \times g$  und bei 4°C durchgeführt. Abhängig von der Viskosität der Proteinlösung wurde bis zu 24 Stunden zentrifugiert.

### **4.2.4 Fällung von Proteinen**

Vor der Gelanalyse von Proteinen war es häufig aufgrund des niedrigen Proteingehaltes der Proben bzw. der Unempfindlichkeit der entsprechenden Gelanalyse notwendig, die Proteine durch Fällung zu konzentrieren.

#### **4.2.4.1 Fällung mit Trichloressigsäure**

Proben für die Gelanalyse, deren Volumen maximal 750 µl betrug und die störende Substanzen enthielten, wurden mit 20 % (v/v) Trichloressigsäure gefällt. Hierzu wurde die Proteinlösung mit dem gleichen Volumen an vorgekühlter 20 % (v/v) TCA versetzt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Lösung wurde anschließend bei  $13.800 \times g$  und 4°C zentrifugiert. Das Sediment wurde zweimal mit je 1,5 ml auf -80°C vorgekühltem 80 % (v/v) Aceton gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Sediment an der Luft getrocknet.

Zur weiteren Verarbeitung wurde die Probe in Puffer aufgenommen.

#### 4.2.4.2 Fällung mit Aceton

Aus Volumina größer als 750 µl wurden Proteine mit Hilfe von Aceton gefällt. Hierzu wurde mit auf -80°C gekühltem Aceton in der Probe eine Endkonzentration von 80 % (v/v) Aceton eingestellt. Der Ansatz wurde für mindestens eine Stunde bei 40°C inkubiert und anschließend wurden die ausgefällten Proteine durch Zentrifugation ( $13.800 \times g$ , RT, 30 Minuten) sedimentiert. Das Sediment wurde an der Luft getrocknet.

#### 4.2.5 Gelanalyse von Proteinen

Um Proteine für analytische Zwecke zu trennen, wurden die Proben mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese getrennt. Bei dieser Methode wird ein elektrisches Feld an eine Matrix – in diesem Fall eine quervernetzte Polyacrylamidmatrix – angelegt, in dem die Proteine aufgrund ihrer Ladung wandern. Da Proteine sich in Nettoladung und sphärischer Form unterscheiden, werden sie mit Natriumdodecylsulfat denaturiert. Hierbei lagern sich die hydrophoben Enden der SDS-Moleküle in die Aminosäureketten ein, die hydrophile Sulfatgruppe hält Kontakt zu dem umgebenden Medium. Dadurch entfalten sich die Proteine und erhalten eine ähnliche sphärische Form. Weiterhin lagern sich die Proteine in SDS-Micellen ein, und die ursprüngliche Nettoladung der Proteine wird durch die negative Ladung der SDS-Moleküle maskiert. Diese beiden Effekte führen dazu, daß der Einfluß der sphärischen Form und der ursprünglichen Ladung der Proteine auf die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine in einem Gemisch für die Proteine annähernd gleich sind. Durch den Siebeffekt der Matrix werden die Proteine nach ihrer Molmasse getrennt.

##### 4.2.5.1 Modifizierte SDS-Gelelektrophorese nach Neville [1971]

Bei dieser Methode werden Proteine durch diskontinuierliche SDS-PAGE im Boratpuffer-System getrennt. Es werden zwei unterschiedliche Gele verwendet, deren Puffersysteme sich in ihren pH-Werten um etwa zwei Größenordnungen unterscheiden. Im Sammelgel wird eine Konzentrierung der Proteine in der Laufrfront erreicht, welche dann im Trenngel nach Molekulargewicht getrennt werden. Durch das diskontinuierliche System wird eine größere Trennschärfe erreicht.

Acrylamidlösung (40 % T, 2 % C):	39,2 % (w/v) Acrylamid 0,8 % (w/v) Bisacrylamid
Trenngelpuffer, pH 8,3	400 mM Tris 400 mM Borsäure 10 mM EDTA 0,4 % (w/v) SDS
Sammelgelpuffer, pH 6,8 (HCl)	400 mM Tris 0,4 % (w/v) SDS
Elektrodenpuffer	Trenngelpuffer 1:4 mit dH <sub>2</sub> O verdünnt

APS-Lösung	12,5	% (w/v)	Ammoniumperoxodisulfat
Probenpuffer, pH 8,3	25	mM	Tris
	25	mM	Borsäure
	1	mM	EDTA
	2	% (w/v)	SDS
	2	M	Harnstoff
	0,002	% (w/v)	Bromphenolblau

Für ein Trenn- und Sammelgel der Größe 10 x 10 cm wurden folgende Komponenten zusammenpipettiert:

Trenngel (10 %)	5	ml	Acrylamidlösung
	5	ml	Trenngelpuffer
	10	ml	dest. H <sub>2</sub> O
	20	µl	TEMED
	200	µl	APS
Sammelgel (4 %)	0,4	ml	Acrylamidlösung
	1	ml	Sammelgelpuffer
	2,6	ml	dest. H <sub>2</sub> O
	4	µl	APS
	20	µl	TEMED

Für ein Gel der Größe 20 x 20 cm wurden die doppelten Mengen für Trenn- und Sammelgel angesetzt. Die Geldicke betrug 1 mm.

Die verwendeten Glasplatten wurden vor dem Zusammenbau mit Spülmittel gereinigt, mit dest. Wasser abgespült, trocken gerieben und nochmals mit Isopropanol gereinigt. Die entsprechenden Abstandshalter wurden zwischen den Platten eingelegt, die Platten wurden mit Klammern fixiert und anschließend wurden die Seitenränder und die Unterseite mit Agarose abgedichtet. Die Trenngellösung wurde eingefüllt und mit Isopropanol überschichtet.

Nach der Polymerisation wurde das Isopropanol abgegossen und das polymerisierte Trenngel wurde mit der Sammelgellösung überschichtet, in welches dann der Taschenformer eingesetzt wurde.

Die Proben wurden mit dem gleichen Volumen Auftragspuffer versetzt oder, wenn die Proben zuvor mit TCA oder Aceton gefällt wurden, in bis zu 50 µl Auftragspuffer aufgenommen. Anschließend wurden die Proben 5 Minuten bei 100°C im Wasserbad erhitzt. Sollte unter reduzierenden Bedingungen getrennt werden, wurde dem Auftragspuffer β-Mercaptoethanol in einer Konzentration von 10 % (v/v) zugesetzt.

Die Elektrophorese wurde für 1 bis 3 Stunden bei 150 - 200 V durchgeführt.

### 4.2.5.2 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Sollten komplexe Proteingemische für analytische Zwecke getrennt werden, wurde die zweidimensionale Gelelektrophorese angewendet. Bei dieser Methode werden die Proteine in der ersten Dimension nach ihrem isoelektrischen Punkt aufgetrennt. Hierbei wandert ein Protein in einem elektrischen Feld und einem pH-Gradienten solange, bis aufgrund des lokalen pH-Wertes im Kapillargel die Nettoladung des Proteins gleich null wird. In der zweiten Dimension werden die nach dem isoelektrischen Punkt getrennten Proteine nach ihrem Molekulargewicht mit einer diskontinuierlichen SDS-PAGE getrennt. Mit dieser Methode lassen sich Proteingemische, welche bis zu 1000 verschiedene Proteine enthalten, problemlos trennen.

#### 4.2.5.2.1 Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung

Acrylamidlösung (30 % T, 5,3 % C)	28,41 % (w/v) Acrylamid 1,59 % (w/v) Bisacrylamid
Ampholyte	Servalyte 3 - 10 Servalyte 5 - 9
APS-Lösung	12,5 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat
Äquilibrierungspuffer	25 mM Tris, pH 8,3 25 mM Borsäure 1 mM EDTA 2 % (w/v) SDS 2 M Harnstoff 10 % (v/v) $\beta$ -Mercaptoethanol 0,002 % (w/v) Bromphenolblau
Kammerpuffer A	20 mM Natronlauge
Kammerpuffer B	10 mM o-Phosphorsäure
Nonidetlösung	20 % (v/v) Nonidet P 40
Harnstofflösung	8 M Harnstoff
Probenpuffer	9,5 M Harnstoff 2 % (v/v) Nonidet P 40 1,6 % (v/v) Servalyte 5 - 9 Vor der Zugabe der Ampholyte wurde die Lösung über Amberlite MB 1 gerührt.
Reinigungslösung A	5 % (v/v) Wasserstoffperoxid 83,3 % (v/v) Schwefelsäure
Reinigungslösung B	20 % (w/v) Kaliumhydroxid In abs. Methanol lösen.



**Überschichtungspuffer**

8 M Harnstoff  
1 % (v/v) Servalyte 3 - 10

Die für die isoelektrische Fokussierung verwendeten Glasröhrchen (150 mm x 2 mm) wurden vor dem Einfüllen der Gellösung mindestens eine Stunde in Reinigungslösung A inkubiert. Nachdem die Gasentwicklung aufhörte, wurden die Röhrchen ausgiebig mit destilliertem Wasser gespült. Anschließend wurden sie 10 Minuten in Reinigungslösung B inkubiert und danach wiederum ausgiebig mit destilliertem Wasser gespült. Zum Trocknen wurden die Röhrchen in einem Trockenschrank bei 80°C gelagert. Vor dem Befüllen mit Gellösung wurden die Röhrchen am unteren Ende mit Parafilm abgedichtet und in den Gießständer eingespannt.

Zur Zubereitung der Gellösung wurden 4,12 g Harnstoff, 1 ml Acrylamidlösung und 750 µl Nonidet P 40-Lösung mit dest. H<sub>2</sub>O auf 7,5 ml aufgefüllt und so lange gerührt, bis sich der Harnstoff vollständig gelöst hatte. Um aus der Lösung störende Ionen zu entfernen, wurde der Ansatz 30 Minuten über Serdolit MB-1 gerührt und zum Abtrennen des Anionenaustauschers sterilfiltriert (Membranfilter, Porengröße 0,2 µm). Zu der verbleibenden Lösung (ca. 6 ml) wurden 37,5 µl Servalyte 3 - 10 und 150 µl Servalyte 5 - 9 zur Ausbildung des pH-Gradienten und zur Polymerisation 7,5 µl TEMED und 25 µl APS-Lösung gegeben. Die Lösung wurde luftblasenfrei mit einer Kanüle in die Röhrchen eingefüllt (Füllhöhe ca. 10 cm) und mit Harnstofflösung überschichtet.

Die untere Kammer der Elektrophorese-Apparatur wurde mit 2 l Kammerpuffer B gefüllt, die Röhrchen wurden eingesetzt und der Parafilm an den Röhrchen wurde, um Stromfluß zu gewährleisten, perforiert. Anschließend wurde der Polymerisationspuffer durch Überschichtungspuffer ersetzt. In die obere Kammer wurden 600 ml Kammerpuffer A eingefüllt und es wurde eine Vorfokussierung bei 500 V für 60 Minuten durchgeführt. Durch die Vorfokussierung bildet sich der notwendige Gradient innerhalb des Gels aus. Die Apparatur wurde während der Elektrophorese kontinuierlich auf 10°C gekühlt.

Im Anschluß an die Vorfokussierung wurde der Überschichtungspuffer in den Kapillaren vorsichtig mit 50 µl Probe unterschichtet und evtl. nochmals mit Überschichtungspuffer aufgefüllt. Die Fokussierung wurde über Nacht bei 500 V und 2 W bei 10°C durchgeführt.

Nach der Fokussierung wurden die Gele vorsichtig aus den Kapillaren mit Wasserüberdruck herausgepreßt und für mindestens 15 Minuten in Äquilibrationpuffer bei 60°C inkubiert. Wurden die Kapillargele nicht sofort weiterverarbeitet, wurden sie in Äquilibrationpuffer bei -20°C gelagert.

#### **4.2.5.2.2 Zweite Dimension: SDS-Gelelektrophorese**

Zur Trennung der Proben in der zweiten Dimension wurde ein 20 x 20 cm großes, 2 mm dickes Polyacrylamidgel, wie unter 4.2.5.1 beschrieben, hergestellt. Zur Formung der Taschen wurde ein Einsatz verwendet, der eine ca. 10 cm x 1,5 cm große Tasche formte.

Das in Äquilibrationpuffer äquilibrierte Kapillargel aus der ersten Dimension (s. 4.2.5.2.2) wurde so luftblasen- und wellenfrei in die große Tasche eingelegt, daß direkter Kontakt zu dem Sammelgel bestand. Bei dem Einlegen des Kapillargels wurde darauf geachtet, daß der niedrige pH-Wert immer zur linken Seite des SDS-Gels orientiert war. In die kleine Tasche wurden 15 µl Proteingrößenstandard (1 mg/ml) aufgetragen.

Die Elektrophorese erfolgte wie unter 4.2.5.1 beschrieben.

## 4.2.6 Färbemethoden für SDS-Polyacrylamidgele

### 4.2.6.1 Silberfärbung nach Blum et al. [1987]

Bei dieser Methode lassen sich Proteine bis zu einer Menge von 10 ng pro Protein nachweisen.

Die Polyacrylamidgele wurden entsprechend der nachfolgenden Vorschrift behandelt. Alle Lösungen wurden mit dest. H<sub>2</sub>O frisch angesetzt, ebenso wurde für die Waschschrirte dest. H<sub>2</sub>O verwendet.

Schritt	Lösung	Inkubationszeit
Fixieren	30 % (v/v) Ethanol, 12 % (v/v) Essigsäure	mind. 1 h
Waschen	50 % (v/v) Ethanol	3 x 20 min
Quellen	H <sub>2</sub> O	20 min
Vorbehandlung	10 mg Natriumthiosulfat in 50 ml dest. H <sub>2</sub> O	1 min
Waschen	H <sub>2</sub> O	3 x 20 sec
Imprägnierung	100 mg Silbernitrat + 25 µl 37 % (v/v) Formaldehydlösung	20 min
Waschen	H <sub>2</sub> O	2 x 20 sec
Entwicklung	3 g Kaliumcarbonat + 25 µl 37 % (v/v) Formaldehydlösung in 50 ml H <sub>2</sub> O	bis zur gewünschten Färbung
Waschen	H <sub>2</sub> O	2 x 20 sec
Abstoppen	50 % (v/v) Ethanol, 12 % (v/v) Essigsäure	10 min
Waschen	50 % (v/v) Methanol	10 min
Quellen	H <sub>2</sub> O	mind. 10 min

Waren die Gele zu stark gefärbt, wurden sie nach dem Abstoppen wie folgt entfärbt:

Entfärben	0,01 % (w/v) Natriumthiosulfat 0,002 % (w/v) Natriumhexacyanoferrat (III)	bis zur gewünschten Entfärbung
Abstoppen	50 % (v/v) Ethanol, 12 % (v/v) Essigsäure	2 x 5 min

Nach der Dokumentation der Gele wurden diese in Cellophanfolie eingeschlagen und in einem Geltrockner getrocknet.

#### 4.2.6.2 Coomassie Brilliant Blau-Färbung nach Neuhoﬀ [1988]

Bei dieser Methode handelt es sich um eine Kolloidalfärbung mit einer Nachweisgrenze von 50 ng pro Protein.

Fixierung	12	% (w/v)	Trichloressigsäure
Waschlösung	8	% (w/v)	Ammoniumsulfat
	1,88	% (v/v)	85 % o-Phosphorsäure
Stammlösung 1	10	% (w/v)	Ammoniumsulfat
	2,35	% (w/v)	85 % o-Phosphorsäure
Stammlösung 2	5	% (w/v)	Coomassie Brilliant Blau G 250
Färbelösung	0,08	% (w/v)	Coomassie Brilliant Blau G 250
	8	% (w/v)	Ammoniumsulfat
	1,88	% (v/v)	85 % o-Phosphorsäure
	20	% (v/v)	Methanol

Die Färbelösung wird durch Mischen von 156,8 ml Stammlösung 1, 3,2 ml Stammlösung 2 und 40 ml Methanol erhalten.

Die zu färbenden Gele wurden nach der Elektrophorese mind. eine Stunde in der Fixierlösung inkubiert, mit Waschlösung 30 Sekunden gewaschen und über Nacht mit Färbelösung gefärbt. Nach der Färbung wurde die Lösung verworfen und das gefärbte Gel wurde bis zur gewünschten Hintergrundfärbung mit 25 % (v/v) Methanol entfärbt. Anschließend wurde das Gel mindestens eine Stunde mit dest. Wasser gewaschen und dann in Cellophanfolie eingeschlagen und getrocknet.

#### 4.2.7 Elektrotransfer von Proteinen aus SDS-Polyacrylamidgelen

Um Proteine nach der Elektrophorese weiteren analytischen Verfahren zugänglich zu machen, wurden diese mit Hilfe des sogen. Western-Blot-Verfahrens [Khyse-Andersen, 1984] auf Nitrocellulose- oder PVDF-Membranen überführt. Die Proteine können nach dem Transfer immunchemisch oder proteinchemisch analysiert werden.

Kathodenpuffer, pH 9,4	25	mM	Tris
	40	mM	ε-Aminocaprinsäure
	0,1	% (w/v)	SDS
	20	% (v/v)	Methanol
Anodenpuffer I, pH 10,4	300	mM	Tris
	20	% (v/v)	Methanol

Anodenpuffer II, pH 10,4	25	mM	Tris
	20	% (v/v)	Methanol

Insgesamt 7 Whatman 3MM-Papiere und eine Blotmembran (Nitrocellulose oder PVDF-Membran) wurden auf die Größe des Gels zugeschnitten. Je zwei Filterpapiere wurden mit Anodenpuffer I und Anodenpuffer II getränkt. Drei Filterpapiere wurden in Kathodenpuffer gelegt. Die Membran wurde mit Anodenpuffer II benetzt. Wurde eine PVDF-Membran verwendet, mußte diese aufgrund ihrer Hydrophobizität vor dem Benetzen mit Anodenpuffer II ca. 10 Sekunden mit Methanol benetzt werden.

Vor dem Zusammenbau wurde das Gel mit Kathodenpuffer benetzt und der Blot wurde wie folgt aufgebaut:

Auf die Anode wurden die Filterpapiere mit Anodenpuffer I gelegt, darauf kamen die Filterpapiere mit Anodenpuffer II. Es folgte die Blotmembran, auf die das Gel gelegt wurde. Zum Abschluß wurden auf das Gel die drei mit Kathodenpuffer getränkten Filterpapiere gelegt, überschüssiger Puffer wurde herausgedrückt und die Apparatur (Semi-Dry Fast-Blot-Apparatur, BioRad) wurde verschlossen. Der schematische Aufbau geht aus Abbildung 4-1 hervor.

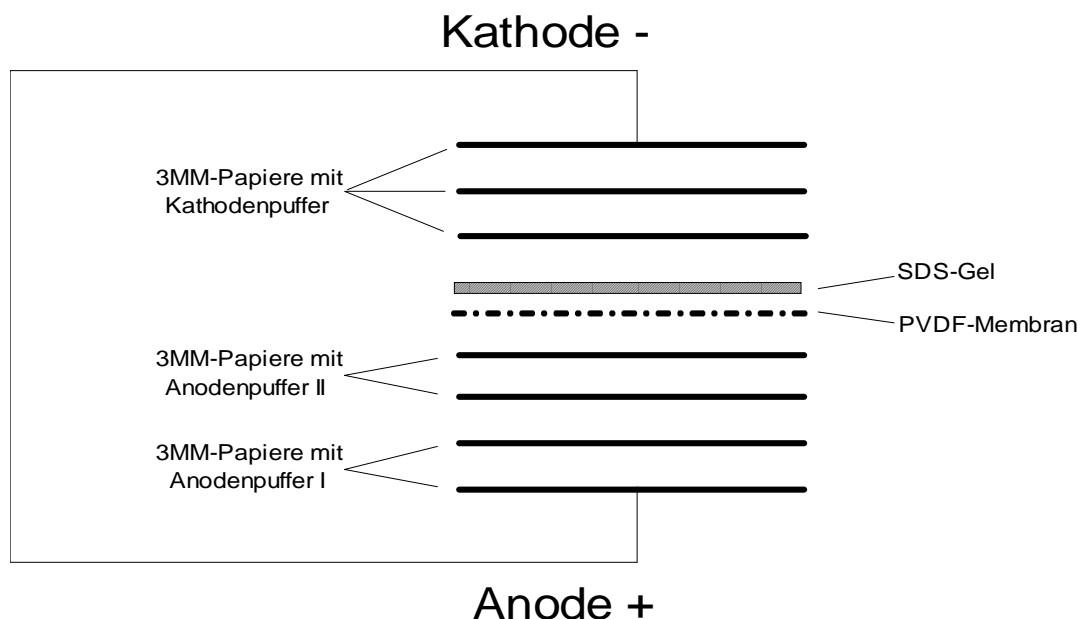


Abb. 4-1: Schematischer Aufbau der Blot-Apparatur für den Elektrottransfer von Proteinen.

An das Gel wurde eine Stromstärke von 2-5 mA/cm<sup>2</sup> angelegt. Die Spannung durfte 25 V nicht übersteigen. Konnte aufgrund der Größe des Gels die erforderliche Stromstärke nicht erreicht werden, wurde mit einer maximalen Stromstärke von 150 mA geblottet. Die Blotdauer betrug maximal 60 Minuten.

Nach dem Blotten wurde die Membran aus der Apparatur entfernt und sofort der weiteren Verarbeitung zugeführt. Hierbei war zu beachten, daß die Membran nicht trocknete.

## 4.2.8 Färbemethoden für Blotmembranen

### 4.2.8.1 Coomassie Brilliant Blau-Färbung von PVDF-Membranen

[Matsudaira, 1987]

Färbelösung	0,1 % (w/v)	Coomassie Brilliant Blau R 250
	50 % (v/v)	Methanol
Entfärber	50 % (v/v)	Methanol
	10 % (v/v)	Essigsäure

Die feuchten PVDF-Membranen wurden nach dem Blotten mindestens 5 Minuten unter Schütteln in Färbelösung inkubiert und anschließend bis zur gewünschten Entfärbung des Hintergrundes mit Entfärber entfärbt. Dabei war es notwendig, den Entfärber mehrmals zu wechseln.

Der Entfärber konnte durch Filtern über Aktivkohle regeneriert und somit mehrmals verwendet werden.

Nach dem Entfärben wurde die Membran auf Filterpapier an der Luft getrocknet.

### 4.2.8.2 Ponceau S-Färbung von Nitrocellulosemembranen

[Harlowe und Lane, 1988]

Ponceau S-Lösung	0,2 % (w/v)	Ponceau S
	2 % (w/v)	TCA

Wurden Proteine auf Nitrocellulosemembranen transferiert, wurden diese Membranen mit Ponceau S gefärbt. Hierzu wurden die Nitrocellulosefilter getrocknet und anschließend mindestens 10 Minuten unter Schütteln in der Färbelösung inkubiert. Entfärbt wurden die Filter bis zur gewünschten Hintergrundfärbung durch Waschen mit dest. H<sub>2</sub>O. Durch ausgiebiges Waschen mit Wasser konnten die Filter vollständig entfärbt werden.

### 4.2.8.3 Immunchemische Färbung von Nitrocellulosemembranen

[Harlowe und Lane, 1988]

Zum immunchemischen Nachweis von Proteinen wurden auf Nitrocellulosemembranen transferierte Proteine mit Antikörpern gegen *N*-Acetyl-S-Transferase (freundlicherweise von Herrn Dr. A. Aigner zur Verfügung gestellt) gefärbt.

TBST, pH 8,0	10 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	150 mM	NaCl
	0,05 % (v/v)	Tween 20
TBST-Blotto, pH 8,0		TBST-Puffer
	5 % (w/v)	Magermilchpulver

AP-Puffer, pH 9,5	100 mM 100 mM 5 mM	Tris NaCl MgCl <sub>2</sub>
STOP-Puffer, pH 8,0	20 mM 5 mM	Tris-HCl, pH 8,0 EDTA
NBT-Lösung	5 % (w/v) 70 % (v/v)	NBT DMF
BCIP-Lösung	5 % (w/v) In 100 % DMF lösen.	BCIP
Substratlösung	0,016 % (w/v) 0,033 % (w/v) In AP-Puffer lösen.	BCIP NBT
1. Antikörperlösung	Gereinigte Anti-NAcT-IgG in 1:1000 in TBST-Puffer verdünnt.	
2. Antikörperlösung	Alkalische Phosphatase-konjugierte Anti-(Kaninchen-IgG)-IgG aus Ziege 1:15.000 in TBST-Puffer verdünnt.	

Vor dem Färben mit Antikörpern wurde die Markerspur auf der Blotmembran in Längsrichtung halbiert. Der abgetrennte Streifen wurde mit Ponceau S gefärbt, der Rest der Membran nach der nachstehenden Vorschrift. Wenn nicht anders vermerkt, wurden die Schritte bei Raumtemperatur unter Schütteln durchgeführt.

1. Waschen	3 x 5 min	TBST-Puffer
2. Absättigen	1 - 2 h, oder ü. N. bei 4°C	TBST-Blotto
3. Waschen	3 x 5 min	TBST-Puffer
4. 1. Antikörperbindung	ü. N. bei 4°C	1. Antikörper in TBST
5. Waschen	3 x 10 min	TBST-Puffer
6. 2. Antikörperbindung	2 h	2. Antikörper in TBST
7. Waschen	2 x 10 min	TBST-Puffer
8. Äquilibrieren	1 x 10 min	AP-Puffer
9. Farbreaktion	bis zur gewünschten Färbung	Substratlösung, frisch zubereitet
10. Abstoppen	1 x 1 min und 1 x 10 min	STOP-Puffer
11. Waschen	1 x 1 min	dest. H <sub>2</sub> O

Die Nitrocellulosemembran wurde anschließend getrocknet und lichtgeschützt aufbewahrt.

## 4.2.9 Experimente zur Solubilisierung der *N*-Acetyl-S-Transferase

### 4.2.9.1 Solubilisierung mit nichtdetergenten Sulfobetainen

[Vuillard, 1995]

Nichtdetergente Sulfobetaine werden als Stabilisatoren und solubilisierungsverstärkende Substanzen bei Membranproteinen eingesetzt. Die Wirkweise hängt jedoch stark von dem zu untersuchenden Membranprotein und dem verwendeten nichtdetergenten Sulfobetain, in Verbindung zu dem in Lösung befindlichen Detergens, ab. Ihre Wirkung entfalten nichtdetergente Sulfobetaine in einer Konzentration von 1 molar. Die nichtdetergenten Sulfobetaine (NDSB) werden nach ihrer Molmasse bezeichnet.

Die nichtdetergenten Sulfobetaine wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Vuillard, Frankreich, zur Verfügung gestellt.

TDG, pH 7,8	10 mM Tris-HCl, pH 7,8 1 mM DTT 20 % (v/v) Glycerin
TDGC, pH 7,8	5 mg/ml CHAPS In TDG, pH 7,8 gelöst.
TDGD, pH 7,8	5 mg/ml DesoxyBIGCHAP In TDG, pH 7,8 gelöst.
TDGC195	1 M NDSB 195 In TDG, pH 7,8
TDGC201	1 M NDSB 201 In TDG, pH 7,8
TDGC256	1 M NDSB 256 In TDG, pH 7,8

6 Ansätze zu 0,13 g Mikrosomen (s. 4.2.10.1) wurden in jeweils 1 ml der o. a. Puffer resuspendiert und 3 Minuten in einem Mikroreagenzgefäß auf einem Mikroreagenzgefäßmischer gemischt. Von den Ansätzen wurden 200 µl als Probe für Aktivitätstests entnommen. Die nichtgelösten Bestandteile der verbleibenden Homogenisate wurden durch Zentrifugation bei  $13.800 \times g$  und Raumtemperatur sedimentiert. Die Überstände wurden mit einer Pipette abgenommen und im nichtradioaktiven Aktivitätstest vermessen.

### 4.2.9.2 Solubilisierung mit Detergenzien

TDGdet, pH 7,3	10 mM Tris-HCl, pH 7,3 1 mM DTT 20 % (v/v) Glycerin 5 x cmc Detergens (cmc entsprechend nachstehender Tabelle)
----------------	---

Die cmc (critical micellar concentration) der eingesetzten Detergenzien sind nachstehend aufgeführt [nach E. L. V Harris und S. Angal, 1986]:

Tab. 4-2: cmc der eingesetzten Detergenzien.

Detergens	cmc [% (w/v)]
CHAPS	0,49
DesoxyBIGCHAP	0,25
Niccol	0,0015
Nonidet P 40	0,023
Triton X-100	0,015
Triton X-114	0,009
Tween 20	0,006
Tween 80	0,0015

Zusätzlich zu den Ansätzen mit Detergens wurden Hochsalzbedingungen (1 M KCl und 1 M NaCl) eingestellt.

0,1 g Mikrosomen wurden in je 1 ml TDG-Puffer, pH 7,3 resuspendiert und 15 Minuten bei RT gerührt. Insgesamt wurden 10 Ansätze hergestellt. Anschließend wurde zu den Ansätzen je 1 ml TDGdet mit den verschiedenen Detergenzien bzw. mit den Salzen gegeben und weitere 15 Minuten bei RT gerührt. Von den erhaltenen Homogenisaten wurden 200 µl als Referenzen abgezogen, die verbleibenden Homogenisate zentrifugiert ( $13.800 \times g$ , RT, 10 Minuten) und die Überstände bzw. die Referenzen mit dem nichtradioaktiven Aktivitätstest vermessen.

#### 4.2.9.3 Solubilisierung mit Triton X-114

SDK-Puffer	250 mM	Saccharose
	200 mM	KCl
	1 mM	DTT

2 g Mikrosomen wurden in 48,5 ml SDK-Puffer, der 3 % (v/v) Triton X-114 enthielt, resuspendiert und mit einem Dounce-Glasschliffhomogenisator (3 bis 5 Hübe) homogenisiert. Danach wurde 30 min auf Eis gerührt und der Ansatz anschließend 30 Minuten bei 25°C inkubiert. Zur Phasentrennung wurde 30 Minuten zentrifugiert ( $7710 \times g$ , 8000 rpm, SS34-Rotor, 25°C).

#### 4.2.9.4 Solubilisierung mit Phospholipase C

Periphere Membranproteine, welche über einen Phosphatidyl-Inositol-Anker an der Membran verankert sind, können mit Hilfe der Phospholipase C (EC 3.1.4.3) freigesetzt werden.

Tris-Puffer, pH 7,4	100 mM	Tris-HCl, pH 7,4
---------------------	--------	------------------



Phospholipase C	0,35 mg/ml	Phospholipase C, Typ XI ( <i>B. cereus</i> )
-----------------	------------	---

0,2 g Mikrosomen (s. Kap. 4.2.10.1) wurden in 10 ml Tris-Puffer, pH 7,4 homogenisiert und 10 Minuten bei RT gerührt. Anschließend wurden zu jeweils 1 ml der Suspension 0,5, 1, 1,5 und 2 U Phospholipase C pipettiert. Die Ansätze wurden 3 Stunden bei 30°C im Wasserbad inkubiert. Im Anschluß daran wurden die Ansätze 10 Minuten zentrifugiert ( $13.800 \times g$ , RT) und der Überstand, wie auch eine zuvor entnommene Probe der Suspension, wurden sofort mit dem nichtradioaktiven Aktivitätstest vermessen. Als Referenz wurde Suspension ohne Phospholipase C eingesetzt, welche exakt wie die Ansätze mit Phospholipase C behandelt wurde.

#### 4.2.10 Säulenchromatographische Methoden zur partiellen Reinigung der *N*-Acetyl-S-Transferase

##### 4.2.10.1 Präparation der mikrosomalen Fraktion aus Schweinenieren [Lambert, 1991]

SD-Puffer	250 mM	Saccharose
	1 mM	DTT
Tris-Puffer, pH 8,0	150 mM	Tris-HCl, pH 8,0

Die für die Mikrosomenpräparation notwendigen Schritte wurden bei 4°C ausgeführt. Von vier schlachtfrischen oder gefrorenen Schweinenieren wurde mit einem Skalpell Nierencortex und -mark entfernt und anschließend grob zerkleinert. Das Bindegewebe der Nieren wurde verworfen. Die Cortex- und Markgewebestücke wurden nach Zugabe von 350 ml SD-Puffer mit einem Ultra-Turrax homogenisiert, nicht homogenisierbare Gewebestücke entfernt und anschließend wurde das Homogenisat bei  $680 \times g$  (3000 rpm, 10 Minuten, 4°C, GS 3-Rotor) zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Sediment erneut in 350 ml SD-Puffer homogenisiert (Ultra-Turrax, ca. 5 Hübe). Das Homogenisat wurde erneut bei  $680 \times g$  (3000 rpm, 10 Minuten, 4°C, GS 3-Rotor) zentrifugiert und im Anschluß daran wurden die Überstände vereinigt. Die vereinigten Überstände wurden zur Abtrennung der lysosomalen Fraktion bei  $13.800 \times g$  (9200 rpm, 15 Minuten, 4°C, GS 3-Rotor) zentrifugiert und das Sediment wurde verworfen. Durch Ultrazentrifugation des Überstandes bei  $100.000 \times g$  (27.000 rpm, 1 h, 4°C, SW 28-Rotor) wurden Rohmikrosomen erhalten. Die erhaltenen Rohmikrosomen wurden zur Abtrennung basischer Proteine und mitgeschleppter lysosomaler Fraktion in 120 ml Tris-Puffer, pH 8 resuspendiert, nochmals bei  $13.800 \times g$  (9200 rpm, 15 Minuten, 4°C, GS 3-Rotor) und anschließend bei  $100.000 \times g$  (27.000 rpm, 1 h, 4°C, SW 28-Rotor) zentrifugiert. Die so erhaltenen Mikrosomen wurden in flüssigem Stickstoff gefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert.

##### 4.2.10.2 Solubilisierung und Polyethylenglykol-Fällung

SDK-Puffer	250 mM	Saccharose
	1 mM	DTT
	200 mM	KCl

SDK-KC-Puffer	20 mM	$\text{KH}_2\text{PO}_4$
	10 mg/ml	CHAPS
In SDK-Puffer lösen.		

PEG-Lösung	50 % (w/v) PEG 6000
------------	---------------------

Ca. 2 g Mikrosomen (s. 4.2.10.1) wurden in 50 ml SDK-Puffer suspendiert und 15 Minuten bei RT gerührt. Zu dieser Suspension wurden 50 ml SDK-KC-Puffer gegeben und erneut 15 Minuten bei RT gerührt. Anschließend wurden nichtlösliche Bestandteile durch Zentrifugation bei  $100.000 \times g$  (27.000 rpm, 4°C, 60 Minuten, SW 28-Rotor) abgetrennt. In dem Überstand wurde mit 50 % (w/v) PEG 6000-Lösung eine Endkonzentration von 10 % (w/v) PEG 6000 eingestellt. Die Zugabe der PEG-Lösung erfolgte durch langsames Eintropfen unter Rühren in den Überstand bei einer Temperatur von 4°C. Die Lösung wurde 30 Minuten unter Rühren auf Eis inkubiert und ausgefallenes Protein durch Zentrifugation bei  $18.000 \times g$  (13.000 rpm, 4°C, 30 Minuten, SS 34-Rotor) sedimentiert. Das erhaltene Sediment wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C aufbewahrt.

#### 4.2.10.3 FPLC-DEAE Blue Anionenaustauschchromatographie

Hier kam ein Säulenmaterial zur Anwendung, welches aus einem Anionenaustauschmaterial (aktive Gruppe: Diethylaminoethyl-Gruppe) und aus einem Farbstoff (Cibacron blue) als zweite aktive Gruppe besteht. Dieses Material eignet sich besonders für Proteine, welche über eine Nukleotid-Bindetasche verfügen.

Die verwendete Säule (Biorad) hatte ein Bettvolumen von 5 ml und eine Partikelgröße von 120 µm. Durchgeführt wurde die Chromatographie an einer FPLC-Anlage von Pharmacia.

TDGC-Puffer, pH 7,3	10 mM	Tris-HCl, pH 7,3
	1 mM	DTT
	20 % (v/v)	Glycerin
	5 mg/ml	CHAPS

TDGCK-Puffer, pH 7,3	1 M	KCl
In TDGC-Puffer lösen.		

0,1 g PEG-Sediment (s. 4.2.10.2) wurde in 5 ml TDGC-Puffer, pH 7,3 gelöst und bei RT 15 Minuten gerührt. Anschließend wurden nichtlösliche Bestandteile durch Zentrifugation bei  $18.000 \times g$  (13.000 rpm, 4°C, 15 Minuten, SS 34-Rotor) abgetrennt und in der Lösung verbleibende kleinere Partikel durch Sterilfiltration durch einen Membranfilter (0,25 µm) entfernt. Von der so erhaltenen Lösung wurden 4 ml auf die Säule aufgetragen.

Die Säule wurde nach dem Auftragen der Proteinlösung mit dem 4-fachen Säulenvolumen gewaschen und die nichtbindende Fraktion wurde gesammelt. Anschließend wurde Protein im linearem aufsteigenden Gradienten von 0 % bis 100 % TDGCK-Puffer, pH 7,3 mit einer Flußrate von 1 ml/min eluiert. Es wurden 40 Fraktionen à 1 ml gesammelt. Die Fraktionen mit den höchsten spezifischen Aktivitäten wurden

vereinigt, in einer Druckdialysezelle eingeeengt und auf eine KCl-Konzentration von unter 70 mM eingestellt.

#### 4.2.10.4 FPLC-Resource Q-Anionenaustauschchromatographie

Bei diesem Material (Pharmacia) handelt es sich um einen starken Anionenaustauscher, bei dem als aktive Gruppe ein quarternärer Ammoniumligand verwendet wird. Das Material hat eine hohe Bindekapazität (25 mg Protein pro ml Säulenmaterial) und ist stabil gegenüber organischen Lösungsmitteln und chaotropischen Lösungen über den gesamten pH-Bereich. Das Säulenbettvolumen betrug 6 ml.

2 g Mikrosomen wurden in 35 ml TDGC-Puffer, pH 7,3 suspendiert und 15 Minuten bei RT gerührt. Die Suspension wurde bei  $100.000 \times g$  (27.000 rpm, 4°C, 60 Minuten, SW 28-Rotor) zentrifugiert und anschließend wurde der Überstand zum Abtrennen kleinerer Partikel steriltfiltriert (Membran mit Porengröße von 0,25 µm). Von dieser Lösung wurden 18 ml in mehreren Schritten auf die Säule aufgetragen. Nach jedem Auftrag von Proteinlösung wurde die Säule gespült, bis in einem der Säule nachgeschalteten Detektor kein Protein mehr detektierbar war. Die nichtbindende Fraktion wurde gesammelt (ca. 60 ml) und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Von der Säule wurde im aufsteigenden Stufengradienten Protein mit TDGCK-Puffer pH 7,3 eluiert. Die Flußrate betrug 1 ml/min. Die Stufen wurden manuell eingefügt und es ergaben sich aus mehreren Läufen folgende Konzentrationsbereiche für die eingefügten Stufen:

Signal	1	2	3	4	5	6
C <sub>KCl</sub> [mM]	92 - 95	192 - 202	310 - 312	428 - 430	345 - 346	668 - 678

Es wurden 120 Fraktionen à 1 ml gesammelt. Die Fraktionen wurden auf ihre *N*-Acetyl-S-Transferase-Aktivität untersucht und anschließend in Stickstoff eingefroren und bei -20 °C gelagert.

#### 4.2.11 Kinetische Daten der *N*-Acetyl-S-Transferase

##### 4.2.11.1 Präparation einer Enzymfraktion aus Schweineniere

Für die kinetischen Untersuchungen war es wichtig, daß die verwendete enzymatische Fraktion weitgehendst frei jeglicher störender Enzyme war. Duffel und Jakoby [1985] beschrieben zwei Enzyme, welche mit dem Aktivitätstest der *N*-Acetyl-S-Transferase interferieren.

Um die Aktivitäten der störenden Enzyme zu minimieren wurden Mikrosomen, wie unter 4.2.10.1 beschrieben, präpariert. Das PEG-Sediment wurde entsprechend dem Kapitel 4.2.10.2 präpariert. Das erhaltene PEG-Sediment wurde mit 10 % (w/v) PEG 6000-Lösung gewaschen und durch Zentrifugation bei  $18.000 \times g$  (13.000 rpm, 4°C, 30 Minuten, SS 34-Rotor) sedimentiert. 0,5 g PEG-Sediment wurden in 10 ml TDGC-Puffer, pH 7,3 aufgenommen und nichtlösliche Bestandteile durch Zentrifugation bei  $18.000 \times g$  (13.000 rpm, 4°C, 30 Minuten, SS 34-Rotor) abgetrennt. Die erhaltene

Proteinlösung wurde aliquotiert (à 1 ml), in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C gelagert.

#### 4.2.11.2 Messung von $K_m$ und $V_{max}$ für verschiedene Cystein-S-Konjugate

Die  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Werte für verschiedene halogenierte Cystein-S-Konjugate (s. Tabelle 4-1) für die durch die *N*-Acetyl-S-Transferase katalysierte Acetylierungsreaktion wurden durch Umsatzmessungen bei verschiedenen Substratkonzentrationen durchgeführt. Dazu wurden die Substrate in den Konzentrationsbereichen, die in Tabelle 4-1 aufgeführt sind, in den radioaktiven Aktivitätstest (s. 4.2.1.1) eingesetzt. Zur Bestimmung des  $K_m$  und  $V_{max}$ -Wertes wurde die unter 4.2.11.1 beschriebene Enzymfraktion eingesetzt.

Zuvor wurde der zeitabhängige Umsatz für jedes Substrat bestimmt. Dazu wurde der Umsatz über einen Zeitraum von bis zu 60 Minuten (abhängig vom Substrat) bei einer Substratkonzentration von 1,2 mM verfolgt.

Der Umsatz wurde durch Pipettieren zweier unabhängiger Ansätze pro Substratkonzentration und zweimaliger Auftragung jedes Ansatzes auf DC-Platten bestimmt. Jeder Meßwert stellt somit das Mittel aus vier Messungen dar. Die Auswertung erfolgte densitometrisch und computergestützt.

Tab. 4-3: Verwendete Cystein-S-Konjugate.

Nr.	Substrat	Inkubationszeit [min]
<b>1a</b>	TFEC	15
<b>1b</b>	CTFC	15
<b>1c</b>	BTFC	2
<b>1d</b>	DBDFC	2
<b>1e</b>	CompdAlkan	4
<b>2a</b>	PCBD	0,5
<b>2b</b>	DCVC	60
<b>2c</b>	CompdAlken	60

#### 4.2.11.3 Temperaturstabilität der *N*-Acetyl-S-Transferase

Um zu ermitteln, über welchen Temperaturbereich die *N*-Acetyl-S-Transferase stabil ist, wurde die Aktivität bei verschiedenen Temperaturen bestimmt. Hierzu wurde wie unter 4.2.1.2 beschrieben der Aktivitätstest bei folgenden Temperaturen durchgeführt: 4°C, 9°C, 13°C, 18°C, 23°C, 27°C, 30°C, 34°C, 37°C, 42°C, 47°C, 52°C, 57°C, 67°C und 77°C. Die Inkubationszeit betrug 30 Minuten. Im Anschluß an die Inkubation bei der entsprechenden Temperatur wurde der Ansatz sofort auf 100°C erhitzt. In den Aktivitätstest wurde die in Kapitel 4.2.11.1 beschriebene Enzymfraktion eingesetzt. Jeder Ansatz wurde zweimal pipettiert und auch zweimal über die HPLC-Anlage analysiert.

Weiterhin wurde der Aktivitätsverlust in der Lösung bei Lagerung bei 4°C über einen Zeitraum von 3 Tagen verfolgt. Dazu wurde eine, wie unter 4.2.11.1 beschriebene,

Enzymfraktion im Wasserbad bei einer Temperatur von 4°C inkubiert. Am Anfang der Inkubation und nach 1, 5, 7, 9, 30, 48 und 72 Stunden wurden aus der Lösung Proben entnommen und direkt in den unter 4.2.1.2 beschriebenen Aktivitätstest eingesetzt.

### 4.3 Molekularbiologische Methoden

Um Kontaminationen zu vermeiden, wurde unter sterilen Bedingungen gearbeitet. Dies beinhaltete das Autoklavieren - soweit dies möglich war - der Lösungen bei 120°C für 20 Minuten und einem Druck von 2 bar oder dem Filtrieren der Lösungen durch einen Sterilfilter (0,2 µm). Glasgeräte wurden zum Sterilisieren über Nacht auf 150°C erhitzt.

#### 4.3.1 Kultivierung von *E.coli* Bakterien

Alle Arbeiten mit Bakterienkulturen wurden in einer Sterilwerkbank durchgeführt, die Arbeitsflächen wurden vor und nach den Arbeiten mit 70 % (v/v) Isopropanol abgewischt. Medien und Glasgeräte, welche mit Bakterienkulturen in Kontakt kamen, wurden autoklaviert.

##### 4.3.1.1 Medien zur Kultivierung von *E.coli* Bakterien

Die Kultivierung von *E.coli* XL-1 Blue erfolgte mit Hilfe folgender Lösungen:

LB-Medium	10 g/l	NaCl
	5 g/l	Hefeextrakt
	5 g/l	Casein, enzymatisches Hydrolysat
NZY-Medium	10 g/l	Casein, enzymatisches Hydrolysat
	5 g/l	NaCl
	5 g/l	Hefeextrakt
	2 g/l	MgSO <sub>4</sub>
NZY-Agar	15 g/l	Agar
	In NZY-Medium.	
NZY-Top-Agar	0,7 % (w/v)	Agar
	In NZY-Medium.	
NZY-Top-Agarose	0,7 % (w/v)	Agarose
	In NZY-Medium.	
SOB-Medium	20 g/l	Casein, enzymatisches Hydrolysat
	10 mM	NaCl
	5 g/l	Hefeextrakt
	2,5 mM	KCl
	Nach dem Autoklavieren steril hinzusetzen:	
	5 mM	MgCl <sub>2</sub>
	5 mM	MgSO <sub>4</sub>

SOC-Medium                      20 mM      Glucose  
In SOB-Medium.

Die Kultivierung von *E.coli* Y1090r<sup>-</sup> erfolgte mit Hilfe der nachstehenden Lösungen:

LB-Medium                      10 g/l      Bacto-Trypton  
   5 g/l      Hefeextrakt  
   5 g/l      NaCl

LB-Agar                          15 g/l      Agar  
In LB-Medium.

LB/MgSO<sub>4</sub>/Maltose-Medium      10 mM      MgSO<sub>4</sub>  
In LB-Medium.  
Nach dem Autoklavieren wird eine sterile  
20 % (w/v) Maltose-Stammlösung bis zu einer  
Endkonzentration von 0,2 % (w/v) zugegeben.

LB-Agar/MgSO<sub>4</sub>                      15 g/l      Agar  
   10 mM      MgSO<sub>4</sub>  
In LB-Medium.

LB-Top-Agar                      7,5 g/l      Agar  
   2,4 g/l      MgSO<sub>4</sub>  
In LB-Medium.

LB-Top-Agarose                      7,5 g/l      Agarose  
   2,4 g/l      MgSO<sub>4</sub>  
In LB-Medium.

#### 4.3.1.2 Plattenkulturen

Um einzelne Kolonien von *E.coli* zu gewinnen, wurden aus einer Dauerkultur mit Hilfe einer Impföse Verdünnungsausstriche auf LB-Agarplatten ausgeführt.

Zur Gewinnung von Plattenkulturen von *E.coli* Y1090r<sup>-</sup> wurden ca. 5 µl einer Dauerkultur auf einer LB-Agar/50 µg/ml Ampicilin-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Die Platten wurden anschließend luftdicht mit Parafilm verschlossen und bei 4°C im Dunkeln bis zur Verwendung gelagert.

Bei der Gewinnung von Einzelkulturen des *E.coli*-Stammes XL 1-Blue wurde ähnlich wie bei der Gewinnung von Einzelkulturen des *E.coli*-Stammes Y1090r<sup>-</sup> verfahren. Die Dauerkultur wurde jedoch auf einer LB-Agar/12 µg/ml Tetracyclin-Platte ausgestrichen. Ansonsten wurde wie bei einer *E.coli* Y1090r<sup>-</sup> Plattenkultur verfahren.

#### 4.3.1.3 Flüssigkulturen

Sterile Kulturröhrchen wurden unter sterilen Bedingungen mit 5 ml eines für den zu kultivierenden *E.coli*-Stammes geeignetem Medium gefüllt und mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers angeimpft. Die Röhrchen wurden über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert.

Wurden mehr als 5 ml Bakterienkultur benötigt, wurde von der Übernachtskultur ca. 100 µl Bakteriensuspension in 100 ml eines geeigneten Mediums überführt und erneut über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert.

#### 4.3.1.4 Dauerkulturen

Um Bakterienstämme über längere Zeit lagern zu können, wurden unter sterilen Bedingungen 400 µl Glycerin und 800 µl Bakteriensuspension in einem Kryoröhrchen gemischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C aufbewahrt.

#### 4.3.2 Herstellung kompetenter *E.coli*-Zellen

[Hanahan, 1985]

FSB-Puffer, pH 7,5	100 mM	Kaliumchlorid
	45 mM	Manganchlorid
	10 mM	Calciumchlorid
	10 mM	Kaliumacetat
	3 mM	Hexamincobalt(III)chlorid
	10 % (w/v)	Glycerin
Der Puffer wird sterilfiltriert.		

3 ml LB-Tetracyclin-Medium wurden mit einer Kolonie *E.coli* XL 1-Blue-Zellen angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln im Dunkeln inkubiert. Von dieser Übernachtskultur wurden ca. 10 µl in 50 ml SOB-Medium überführt und bis zu einer OD<sub>556</sub> von 0,5 unter Schütteln bei 37°C inkubiert.

Anschließend wurde die Bakteriensuspension 10 Minuten auf Eis abgekühlt, in sterile SS 34-Zentrifugenbecher überführt und bei 2500 rpm und 4°C 12 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde sofort dekantiert und die sedimentierten Zellen wurden in 14 ml FSB-Puffer resuspendiert. Die Suspension wurde 15 Minuten auf Eis inkubiert und 10 Minuten im SS 34-Rotor bei 2500 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Sediment in 3,36 ml FSB-Puffer aufgenommen und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Zu der Suspension wurden 117,6 µl DMSO gegeben, gemischt und erneut 5 Minuten auf Eis inkubiert. Es erfolgte eine erneute Zugabe von 117,6 µl DMSO und die Zellen wurden anschließend in sterile 1,5 ml Eppendorfgefäße à 210 µl gefüllt. Die Lagerung erfolgte bis zur Verwendung der Zellen bei -80°C.

### 4.3.3 Transformation von kompetenten *E.coli*-Zellen

Ampicillin-Stammlösung	1 % (w/v) Ampicillin Lösung sterilfiltrieren.
IPTG-Stammlösung	100 mM IPTG Lösung sterilfiltrieren.
X-Gal-Stammlösung	4 % (w/v) X-Gal In DMF lösen.

Kompetente Zellen, wie unter Punkt 4.3.2 hergestellt, wurden auf Eis aufgetaut und in einem eisgekühlten, sterilen 12 ml Greiner-Röhrchen wurden 200 µl Zellsuspension vorgelegt. Zu den Zellen wurde 1 ng DNA, gelöst in 10 µl Puffer oder Wasser, hinzugegeben und der Ansatz wurde vorsichtig 5 Sekunden geschüttelt. Anschließend erfolgte eine Inkubation auf Eis für 40 Minuten.

Nach der Inkubation auf Eis wurde der Transformationsansatz exakt 90 Sekunden bei 42°C im Wasserbad erwärmt und anschließend sofort 3 Minuten auf Eis inkubiert. Mit auf 42°C vortemperiertem SOC-Medium wurde der Transformationsansatz auf 1000 µl aufgefüllt und es wurde 60 Minuten bei 37°C unter starkem Schütteln (200 rpm) im Dunkeln inkubiert.

Der Ansatz wurde anschließend auf LB-Agar-Platten verteilt, die wie folgt vorbereitet wurden:

Zunächst wurden auf jeder Platte 40 µl IPTG-Stammlösung ausgestrichen und anschließend 40 µl X-Gal-Stammlösung. Hierbei war es wichtig, daß die Platten nach dem Ausstreichen unter einer Sterilbank getrocknet wurden, da das DMF der X-Gal-Stammlösung ein Zellgift ist, das vollständig verdunsten mußte. Im Anschluß daran wurden 20 µl Ampicillin-Stammlösung ausgestrichen. Auf die so vorbereiteten LB-Agar-Platten wurden dann die Zellen ausgestrichen, wobei auf je zwei Platten jeweils 200 µl, 20 µl und 2 µl Zellsuspension verteilt wurden. Nach dem Trocknen der Platten in einer Sterilbank wurden die Platten bei 37°C über Nacht inkubiert. Positive Transformanten konnten aufgrund der weißen Färbung der Kolonien von negativen Transformanten (blaue Kolonien) selektiert werden.

#### 4.3.4 Isolierung von Nukleinsäuren

#### 4.3.4.1 Gewinnung von Phagenlysat

Von Herrn Dr. A. Aigner konnten aus einer cDNA- $\lambda$ gt11-Phagen-Expressionsbank aus Schweineleber Klone isoliert werden, welche mit Anti-*N*-Acetyl-S-Transferase-Antikörpern [Aigner, 1995] ein positives Signal bei der immunchemischen Färbung ergaben. Zur weiteren Analyse der DNA der Klone mußte diese isoliert werden.

Abschwemmpuffer, pH 7,5	10	mM	Tris-HCl, pH 7,5
	10	mM	MgSO <sub>4</sub>



10 × λ-Verdünnungspuffer	1	M	NaCl
	0,1	M	MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O
	0,35	M	Tris-HCl, pH 7,5
1 × λ-Verdünnungspuffer	100	ml	10 × λ-Verdünnungspuffer
	5	ml	2 % (w/v) Gelatine-Lösung
	Mit H <sub>2</sub> O auf 1 l auffüllen.		

Die Puffer wurden autoklaviert und bei 4°C aufbewahrt.

Die von Herrn Dr. A. Aigner zur Verfügung gestellten Phagensuspensionen (bezeichnet mit A bis H) wurden 1:500 mit 1 × λ-Verdünnungspuffer verdünnt. Von diesen Verdünnungen wurden 800 µl zu 850 µl einer *E.coli* Y1090r<sup>-</sup>-Übernachtskultur pipettiert und 15 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. In der Zwischenzeit wurde LB-Top-Agarose auf 49°C im Wasserbad erwärmt. Die Infektionsansätze wurden zu 30 ml der auf 49°C temperierten LB-Top-Agarose gegeben, durch Invertieren vermischt und anschließend auf großen (22 × 22 cm) LB-Agar/10 mM MgSO<sub>4</sub>-Platten luftblasenfrei ausplattiert. Nach dem Erstarren des Top-Agars (ca. 10 Minuten bei RT) wurden die Platten invertiert und bei 37°C im Dunkeln bis fast zur vollständigen Konfluenz inkubiert.

Zur Gewinnung des Phagenlysats wurden zu 30 ml Abschwemmpuffer 150 µl Chloroform pipettiert, auf die Platten gegeben und über Nacht bei 4°C leicht geschwenkt. Die so gewonnenen Lysate wurden in 25 ml Schraubgefäße gefüllt und bis zur Weiterverarbeitung bei 4°C aufbewahrt.

#### 4.3.4.2 Isolierung von rekombinanter DNA

Abhängig von den benötigten DNA-Mengen wurden zwei verschiedene Methoden zur Isolierung rekombinanter DNA aus *E.coli*-Bakterien verwendet. Wurden geringe Mengen DNA zur Analyse von Klonierungsexperimenten benötigt, wurde die sogenannte Plasmidschnellanalyse angewendet. Die Methode zeichnet sich durch ihren geringen zeitlichen Aufwand aus. Diese Methode hat jedoch den Nachteil, daß geringe Mengen von DNA gewonnen werden bzw. die gewonnene DNA verunreinigt ist. Wurde DNA in größeren Mengen und besonderer Reinheit benötigt, kam die DNA-Präparation mit Qiagensäulen zur Anwendung.

##### 4.3.4.2.1 Plasmidschnellanalyse

[Holmes und Qigley, 1981]

STET-Puffer, pH 8,0	50	mM	Tris
	50	mM	EDTA
	8	% (w/v)	Saccharose
	5	% (v/v)	Triton X-100
	Bei 4°C lagern.		
Lysozym-Lösung	1	% (w/v)	Lysozym

RNase A, pH 5,2	2 % (w/v) RNase A
	100 mM Natriumacetat
	Bei -20°C lagern.
TE-Puffer, pH 8	100 mM EDTA, pH 8,0
	10 M Tris-HCl, pH 8,0

5 ml LB-Amp-Medium wurden mit dem zu untersuchenden Bakterienstamm angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert.

Von der Übernachtskultur wurden 1,5 ml in ein Eppendorfmikroreagenzgefäß überführt und 30 Sekunden bei 13.000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment wurde in 200 µl STET-Puffer resuspendiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 16 µl Lysozymlösung. Der Ansatz wurde kurz geschüttelt und sofort 90 Sekunden bei 100°C im Wasserbad erhitzt. Zur Abtrennung der Zelltrümmer wurde der Ansatz 10 Minuten bei 13.000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Das Sediment wurde mit Hilfe eines Zahnstochers entfernt und aus dem verbleibenden Überstand wurde die Plasmid-DNA mit Isopropanol gefällt. Dazu wurden zu dem Überstand 200 µl auf -20°C gekühltes Isopropanol gegeben und der Ansatz wurde 30 Minuten bei -20°C stehen gelassen.

Die ausgefällte DNA wurde durch 15minütiges Zentrifugieren (13.000 rpm) sedimentiert und der Überstand wurde vorsichtig dekantiert. Das Sediment wurde zweimal mit 200 µl auf -20°C gekühltem 70 % Ethanol gewaschen. Zwischen jedem Waschschrift wurde der Ansatz 5 Minuten in einer Tischzentrifuge zentrifugiert.

Das Sediment wurde an der Luft getrocknet und anschließend in 50 µl TE-Puffer, pH 8 aufgenommen. Zur Hydrolyse evtl. mitgefällter RNA wurde zu der Plasmidlösung 1 µl RNase A pipettiert und 15 Minuten bei 65°C inkubiert.

Die Plasmidlösung wurde bei -20°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

#### 4.3.4.2.2 DNA-Präparation mit Qiagen-Säulenchromatographie

P1-Puffer, pH 8	50 mM Tris, pH 8,0
	10 mM EDTA, pH 8,0
P2-Puffer	200 mM Natriumhydroxid
	1 % (w/v) SDS
P3-Puffer, pH 5,5	3 M Kaliumacetat
L1-Puffer, pH 7,5	100 mM Tris-HCl, pH 7,5
	300 mM NaCl
	10 mM EDTA
	20 mg/ml RNase A
	6 mg/ml DNase I
	0,2 mg/ml BSA
	Lösung bei 4°C aufbewahren.

L2-Puffer	30	% (w/v)	PEG 6000
	3	M	NaCl
	Lösung bei 4°C aufbewahren.		
L3-Puffer, pH 7,5	100	mM	Tris-HCl, pH 7,5
	100	mM	NaCl
	25	mM	EDTA
L4-Puffer	4	% (w/v)	SDS
L5-Puffer	2,55 M		Kaliumacetat, pH 4,8
QBT-Puffer, pH 7,0	50	mM	MOPS (freie Säure)
	750	mM	NaCl
	0,15	% (v/v)	Triton X-100
	15	% (v/v)	Ethanol
QC-Puffer, pH 7,0	50	mM	MOPS (freie Säure)
	1	M	NaCl
	15	% (v/v)	Ethanol
QF-Puffer, pH 8,5	50	mM	Tris, pH 8,5
	1,25	M	NaCl
	15	% (v/v)	Ethanol

Die Präparation von Plasmid-DNA wurde wie folgt durchgeführt:

Von einer Übernachtskultur der zu untersuchenden Bakterienkultur wurden 10 µl zu 150 ml LB-Amp-Medium pipettiert und über Nacht bei 37°C in einem Kolben mit Schikanen unter Schütteln inkubiert. Die Kultur wurde in sterile GSA-Zentrifugenbecher überführt und 5 Minuten bei 8000 rpm (4°C, GSA-Rotor, 10.000 × g) zentrifugiert. Das Bakteriensediment wurde anschließend in 4 ml auf 4°C gekühltem Puffer P1 resuspendiert. Nach dem Resuspendieren wurden 4 ml P2-Puffer zugegeben, sofort gemischt und der Ansatz wurde 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden zu dem Ansatz 4 ml P3-Puffer gegeben, sofort vorsichtig gemischt und 30 Minuten bei 15.000 × g (11.000 rpm, 4°C, SS 34-Rotor) zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand sofort abgezogen. War dieser nicht klar, schloß sich eine weitere Zentrifugation mit 15.000 × g (11.000 rpm, 4°C, 10 Minuten, SS 34-Rotor) an. In der Zwischenzeit wurde eine Qiagen-tip 100 Säule mit 3 ml QBT-Puffer äquilibriert. Der klare Überstand wurde auf die Säule aufgetragen und nach dem Einlaufen der Probe wurde die Säule mit 10 ml QC-Puffer gewaschen. Im Anschluß daran wurde die an die Säule gebundene Plasmid-DNA mit 5 ml QF-Puffer eluiert. Zur Fällung der Plasmid-DNA wurde zu dem Eluat Isopropanol gegeben und nach dem Mischen wurde der Ansatz bei 15.000 × g (11.000 rpm, 4°C, 30 Minuten, SS 34-Rotor) zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und die sedimentierte DNA wurde zweimal mit 0,5 ml 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Zwischen jedem Waschschrift wurde 5 Minuten zentrifugiert (11.000 rpm, 15.000 × g, 4°C, SS 34-Rotor). Das Sediment wurde anschließend an der Luft getrocknet und in sterilem TE-Puffer aufgenommen.

Phagen-DNA wurde wie folgt isoliert:

Das abgeschwemmte Lysat (s. 4.3.4.1) wurde 15 Minuten bei  $13.200 \times g$  (9000 rpm, 4°C, GSA-Rotor) zentrifugiert und das klare Lysat anschließend auf 37°C temperiert. Zu 50 ml Lysat wurden 100 µl L1-Puffer gegeben, gemischt und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 10 ml eiskalter L2-Puffer zugegeben, vorsichtig gemischt und 60 Minuten auf Eis inkubiert. Es erfolgte dann eine Zentrifugation bei  $13.200 \times g$  (9000 rpm, 4°C, 10 Minuten, GSA-Rotor) und der Überstand wurde verworfen. Die Restflüssigkeit wurde durch das Auf-den-Kopf-stellen des Zentrifugenbechers entfernt und das Sediment wurde in 3 ml L3-Puffer mit einer Pipette resuspendiert. Zu dieser Suspension wurden 3 ml L4-Puffer pipettiert und nach dem vorsichtigen Mischen 20 Minuten bei 70°C inkubiert. Nachdem der Ansatz nach der Inkubation auf Eis abgekühlt wurde, wurden 3 ml L5-Puffer zugegeben, sofort vorsichtig gemischt und 30 Minuten bei  $16.000 \times g$  (12.000 rpm, 4°C, JA 20-Rotor) zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der klare Überstand sofort mit einer Pipette abgezogen. Wurden dabei Partikel mit abgezogen, wurde das Lysat erneut 10 Minuten bei  $16.000 \times g$  (12.000 rpm, 4°C, JA 20-Rotor) zentrifugiert. Anschließend wurde die Phagen-DNA mit Hilfe der Qiagen-tip 100-Säule genauso wie die Plasmid-DNA (s. o.) präpariert.

#### **4.3.4.3 Reinigung von Nukleinsäuren**

##### **4.3.4.3.1 Phenolextraktion**

[Sambrook et al., 1989]

Um Proteine, welche bei verschiedenen Anwendungen zur DNA-Lösung gegeben werden müssen, wieder von diesen zu trennen, wurde die Probe mit Phenol extrahiert. Bei dieser Methode wird die unterschiedliche Löslichkeit von Proteinen und Nukleinsäuren in Phenol ausgenutzt.

Die DNA-Lösung wurde mit dem gleichen Volumen mit TE-Puffer gesättigtem Phenol versetzt und intensiv gemischt. Anschließend wurde 5 Minuten bei 13.000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Die obere wäßrige Phase wurde vorsichtig abgezogen, wobei darauf geachtet wurde, daß die sich zwischen der unteren phenolischen und der oberen wäßrigen Phase befindliche Interphase nicht mitgeschleppt wurde. Die wäßrige Phase wurde anschließend noch zweimal wie oben beschrieben mit Phenol extrahiert. Um phenolische Verunreinigungen zu entfernen, wurde die wäßrige Phase zweimal mit dem gleichen Volumen eines Gemisches aus Chloroform und Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Um die Phasentrennung zu erreichen, wurde in einer Tischzentrifuge bei 13.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde die DNA aus der wäßrigen Lösung mit Ethanol (s. 4.3.4.3.2) gefällt.

##### **4.3.4.3.2 Ethanolfällung**

Um die DNA zu konzentrieren, wurde aus größeren Volumina die DNA mit Hilfe von Ethanol gefällt.

Die DNA-haltige Lösung wurde mit dem 2,5-fachen Volumen abs. Ethanol (auf -20°C vorgekühlt) und dem 0,1-fachen Volumen einer 3 M Natriumacetatlösung, pH 7,5

versetzt und sofort gemischt. Anschließend wurde dieser Ansatz mind. eine Stunde bei -20°C aufbewahrt. Um die DNA zu sedimentieren, wurde der Ansatz 30 Minuten bei 13.000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig mit einer Pipette abgezogen und das Sediment wurde zweimal mit 1 ml auf -20°C vorgekühltem 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurde 10 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgezogen und das Sediment wurde 5 Minuten an der Luft getrocknet. Die DNA wurde in TE-Puffer, pH 8 aufgenommen und bis zum weiteren Gebrauch bei -20°C aufbewahrt.

#### **4.3.4.3.3 Elution von DNA aus Agarosegelen**

[Cao und Brosius, 1993]

Zur Ligation von mit Hilfe der PCR (s. 4.3.6) amplifizierten DNA-Insertionen war es notwendig, die entsprechenden, in einem Agarosegel aufgetrennten DNA-Fragmente, zu isolieren.

Das zu isolierende DNA-Fragment wurde nach dem Färben des Gels unter UV-Licht identifiziert und die entsprechende Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten. Hierbei wurde darauf geachtet, daß die Einwirkzeit des UV-Lichts auf die DNA so kurz wie möglich war, um Schäden an der DNA zu vermeiden.

In ein Eppendorfgefäß, bei dem der Boden mit einer Kanüle durchstoßen war, wurde silikonisierte Glaswolle eingebracht, so daß der Boden des Gefäßes ca. 0,5 cm hoch bedeckt war. Auf die silikonisierte Glaswolle wurde das Agarosegelstück mit der darin befindlichen DNA aufgelegt und das verschlossene Eppendorfgefäß wurde in ein zweites, nicht durchstoßenes Gefäß gesteckt. Die so ineinander gesteckten Eppendorfgefäße wurden in ein 12 ml Greiner-Gefäß gebracht und anschließend bei 1500 rpm in einer Labofuge 10 Minuten zentrifugiert. Die zu isolierende DNA sammelte sich mit dem Puffer aus dem Gel in dem unteren Eppendorfgefäß. Aus der so gewonnenen DNA-Lösung wurde die DNA mit Ethanol (s. 4.3.4.3.2) gefällt.

#### **4.3.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Aufgrund des Gehaltes an aromatischen Basen der DNA läßt sich deren Konzentration in einer wäßrigen Lösung über die Absorptionsmessung bei 260 nm abschätzen. Es gilt folgende Näherung:

$$1 A_{260}\text{-Einheit} \approx 50 \mu\text{g/ml dsDNA}$$

Die Messung erfolgte in Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm.

Aus dem Quotienten  $A_{260} / A_{280}$  läßt sich die Reinheit der präparierten DNA abschätzen. Liegt der Wert unter ca. 1,5, ist die Lösung mit Proteinen verunreinigt.

#### 4.3.6 Amplifikation von cDNA-Insertionen mit Hilfe der Polymerasenkettenreaktion (PCR)

[Hla und Maciag, 1990]

Die cDNA-Insertionen aus den Phagen-Klonen B bis H wurden mit Hilfe dieser Methode amplifiziert, da sich die cDNA-Insertionen nicht mit den Restriktionsenzymen direkt restringieren ließen.

Die PCR ermöglicht es, gezielt DNA-Abschnitte zu amplifizieren, welche von zwei bekannten Sequenzen eingerahmt werden. Ausgehend von einem Vorlage- bzw. einem Matrizenmolekül (Template), wird zuerst die doppelsträngige DNA denaturiert. An die einzelsträngige Matrize lagern sich Oligonukleotid-Primer an („Annealing“), die aus den bekannten Sequenzen abgeleitet wurden. Es folgt dann die Synthese der komplementären Stränge durch die hitzestabile *Taq* -DNA-Polymerase. Die Schritte Denaturierung, Annealing und Synthese bilden einen Zyklus, erfordern aber unterschiedliche Temperaturen. Durch das Aneinanderreihen mehrerer dieser Zyklen läßt sich die Zielsequenz spezifisch in ausreichenden Mengen amplifizieren.

10 × Puffer (Gibco, BRL)	200 mM	Tris-HCl, pH 9,3
	500 mM	Kaliumchlorid
Detergens W1 (Gibco, BRL)		
DNTP-Mix	10 mM	dATP
	10 mM	dCTP
	10 mM	dGTP
	10 mM	dTTP
BSA-Lösung	2 mg/ml	BSA
MgCl <sub>2</sub> -Lösung (Gibco, BRL)	50 mM	MgCl <sub>2</sub>
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	5 U/µl	<i>Taq</i> -DNA-Polymerase
Primer	9 pmol/µl	3-in Primer
	14 pmol/µl	5-in Primer

Die Ansätze wurden wie folgt pipettiert:

10	µl	10 × Puffer
2	µl	dNTP-Mix
2	µl	BSA
5	µl	MgCl <sub>2</sub>
5	µl	Detergens W1
2,8	µl	3-in Primer (25 pmol)
1,8	µl	5-in Primer (25 pmol)
1	µl	Matrizen DNA (Klone A-H)
69,9	µl	steriles H <sub>2</sub> O

Zusätzlich zu diesen Ansätzen wurden eine sog. „Wasserprobe“ und eine „Primer-Probe“ als Kontrollen pipettiert. Bei keiner dieser Kontrollen, waren die PCR-Ansätze

frei von Kontaminationen, durften Produkte entstehen. Bei der „Wasserprobe“ wurde keine Matrizen-DNA eingesetzt und bei der „Primer-Probe“ wurde „Fremd“-DNA (cDNA aus Lunge) anstelle der Matrizen-DNA eingesetzt.

Die PCR umfaßte 35 Zyklen, die wie folgt in einem Thermocycler durchgeführt wurden:

40 sec	Denaturieren	bei 94°C
2 min	Hybridisieren	bei 54°C
3 min	Synthese	bei 72°C

An den letzten Amplifikationszyklus schloß sich ein finaler 15minütiger DNA-Syntheseschritt an.

Die Ansätze wurden anschließend in einem Agarosegel aufgetrennt (s. 4.3.6) und die amplifizierte cDNA-Insertion wurde aus dem Gel ausgeschnitten und gereinigt (s. 4.3.4.3.3).

#### 4.3.7 Nicht-denaturierende Agarosegelelektrophorese

Zur Analyse doppelsträngiger DNA wurden native Agarosegele verwendet. Die Konzentration der Agarose richtete sich nach der Größe der zu analysierenden DNA (0,7 % (w/v) bis 1,2 % (w/v)).

50 × TAE-Puffer	10	mM	Tris
	500	mM	EDTA
	5	M	Essigsäure
Auftragspuffer	50	% (v/v)	Glycerin
	0,2	% (w/v)	SDS
	0,05	% (w/v)	Bromphenolblau
	49,8	% (v/v)	1 × TAE-Puffer

Abhängig von der verwendeten Agarosegel-Flachbettapparatur (Mini, ca. 20 ml, Midi, ca. 100 ml oder Maxi, ca. 250 ml) wurde die Agarose in dem entsprechenden Volumen 1 × TAE-Puffer in der Mikrowelle unter Erhitzen gelöst. Der durch das Kochen auftretende Verlust an Flüssigkeit wurde durch Wiegen bestimmt und mit heißem dest. Wasser ausgeglichen. Die heiße Lösung wurde in die vorbereitete Apparatur eingefüllt und der entsprechende Taschenformer wurde in das noch flüssige Gel eingesetzt. Nach dem Erstarren des Gels wurde die Apparatur mit 1 × TAE-Puffer gefüllt, so daß die Lösung das Gel ca. 1 cm hoch bedeckte.

Die Proben wurden mit mind. 1/5 Auftragspuffer versetzt und in die Geltaschen gefüllt. Abhängig von der Gelgröße wurden 80 V für ein Minigel, 120 V für ein Midigel und 150 V für ein Maxigel angelegt. Die Elektrophorese wurde beendet, wenn das Bromphenolblau ca. 3/4 der Laufstrecke zurückgelgt hatte.

Das Gel wurde im Anschluß mit Ethidiumbromid gefärbt und bis zur gewünschten Entfärbung des Hintergrundes in Wasser entfärbt und anschließend fotografiert.

### 4.3.8 Manipulation und Analyse rekombinanter DNA

#### 4.3.8.1 Sequenzspezifische Hydrolyse von DNA

Die sequenzspezifische Hydrolyse - auch Restriktion genannt - wurde mit den Enzymen *Sal*I, *Kpn*I und *Eco*RI in den dafür vorgesehenen 1 × Reaktionspuffern durchgeführt. Die für das Enzym optimale Temperatur wurde entsprechend den Herstellerangaben eingehalten. Inkubiert wurde über Nacht. Die eingesetzte Enzymmenge richtete sich nach der Menge der DNA. Verwendet wurden ca. 1 U pro µg DNA.

Die cDNA-Insertion aus dem Phagenklon A wurde mit *Sal*I und *Kpn*I vorrestringiert, da hier mit *Eco*RI keine vollständige Restriktion erreicht werden konnte. Anschließend wurde die DNA mit *Eco*RI restringiert. Die mit Hilfe der PCR amplifizierten cDNA-Insertionen wurden mit *Eco*RI restringiert. Die Restriktionen wurden durch Phenolextraktion oder Erhitzen auf 65°C für 10 Minuten abgestoppt.

#### 4.3.8.2 5'-Dephosphorylierung des restringierten Vektors

Um die restringierten und isolierten cDNA-Insertionen in einen Vektor zu klonieren, war es notwendig den restringierten Vektor an seinem 5'-Ende zu dephosphorylieren. Dieser Schritt sollte ein Religieren des Vektors bei der Ligation (s. 4.3.8.3) verhindern.

Zu dem mit *Eco*RI restringierten Vektor pBluescript SK(-) (s. 4.3.8.1) wurden gemäß den Herstellerangaben 5 U alkalische Phosphatase pipettiert und der Ansatz wurde 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Abgestoppt wurde die Dephosphorylierung mit 0,5 M EDTA-Lösung, pH 8 und anschließender Inkubation des Ansatzes bei 65°C für 1 Stunde. Das zugegebene Volumen der EDTA-Lösung entsprach 1/100 des Gesamtvolumens des Ansatzes. Die DNA wurde gereinigt (s. 4.3.4.3.1), gefällt (s. 4.3.4.3.2) und in TE-Puffer aufgenommen.

#### 4.3.8.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Ligationslösung	20 µl	10 × Puffer (Pharmacia)
	40 µl	25 % (w/v) PEG
	1 µl	T4 DNA-Ligase (10 U)
	109 µl	dH <sub>2</sub> O

Die cDNA-Insertionen wurden über die kohäsiven *Eco*RI-Schnittstellen in den restringierten und am 5'-Ende dephosphorylierten Vektor ligiert. Vektor und cDNA-Insert wurden im äquimolarem Verhältnis eingesetzt. Die Abschätzung der DNA-Mengen erfolgte mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese über einen Vergleich mit einem mit aufgetragenem DNA-Molekulargewichtsstandard.

Zu 17 µl Ligationslösung wurden die entsprechenden Mengen zu legierender DNA pipettiert und der Ansatz wurde über Nacht bei 16°C inkubiert. Die T4 DNA-Ligase wurde durch Erwärmen auf 65°C für 5 Minuten inaktiviert. Die Ansätze wurden anschließend direkt in die Transformation (s. 4.3.3) eingesetzt.



#### 4.3.8.4 Sequenzanalyse von rekombinanter DNA

Die DNA-Sequenzen der cDNA-Insertionen aus den Phagen-Klonen A-H wurden über die Didesoxy-Methode nach Sanger [1977] bestimmt. Bei dieser Methode wird [<sup>35</sup>S]dATP in DNA-Stränge von der T7 DNA-Polymerase eingebaut, die durch dieses Enzym neu synthetisiert werden. Durch gelelektrophoretische Trennung und nachfolgende Exposition eines Röntgenfilms lassen sich die Fragmente anschließend nachweisen.

Neutralisierungsmix, pH 4,8	357 mM	Kaliumacetat
	85,7 % (v/v)	Ethanol
	Bei -20° C lagern.	
Binde-Silane-Lösung	5 ml	Isopropanol, p.a.
	175 µl	10 % (v/v) Essigsäure
	17,5 µl	Binde-Silane
Acrylamid-Lösung (40 % T, 5 % C)	38 g	Acrylamid
	2 g	Bisacrylamid
10 × TBE-Puffer, pH 8,3	1 M	Tris
	830 mM	Borsäure
	10 mM	EDTA
APS-Lösung	10 % (w/v)	Ammoniumperoxodisulfat
Gellösung	42 g	Harnstoff
	14,5 ml	Acrylamidlösung
	10 ml	10 × TBE-Puffer
	42,5 ml	bidest. H <sub>2</sub> O
	Nach dem Lösen des Harnstoffs	
	30 min mit 5 g Amberlite MB1 rühren,	
	sterifiltrieren (0,2 µm Porengröße) und	
	entgasen.	

Alle weiteren Lösungen waren - wenn nicht anders angegeben - Bestandteil des Sequenzierkits.

Die Plasmid-DNA, welche nach 4.3.4.2.2 präpariert wurde, mußte zuerst denaturiert werden. Dazu wurden 5 µg DNA in 32 µl sterilem bidest. H<sub>2</sub>O aufgenommen und 8 µl frisch angesetzte 2 M NaOH zugegeben. Der Ansatz wurde gemischt und anschließend 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach fünfminütiger Abkühlung auf Raumtemperatur wurden 280 µl eiskaltes Neutralisierungsmix zugegeben, gemischt und 15 Minuten bei -20°C stehen gelassen. Die dabei ausgefällte DNA wurde durch Zentrifugation in einer Tischzentrifuge für 30 Minuten sedimentiert. Der Überstand wurde abgezogen und das Sediment wurde zweimal mit eiskaltem 70 % (v/v) Ethanol (1. mit 800 µl, 2. mit 400 µl) gewaschen. Der Überstand wurde gründlich entfernt und das Sediment wurde in einer Vakuumzentrifuge 5 Minuten getrocknet.

Die denaturierte DNA wurde in 2 µl Primer-Lösung (5 - 10 pmol/µl), 2 µl „Annealing“-Puffer und 10 µl sterilem bidest. H<sub>2</sub>O aufgenommen, gemischt und 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach 10minütigem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der Ansatz kurz in einer Tischzentrifuge zentrifugiert.

Während der Inkubationszeit wurden vier Eppendorf-Gefäße mit den Buchstaben A, C, G und T beschriftet und für die Terminationsreaktion wurde in jedes Reaktionsgefäß 2,5 µl Terminationsmix „short“ vorgelegt.

Zu dem DNA-Primer-Hybrid wurden zur Markierung der DNA 3 µl Labeling Mix-ATP, 1 µl [<sup>35</sup>S]dATP (1000 mCi/mmol) und 2 µl verdünnte (auf 1,5 U/µl in Enzyme Dilution Buffer) T7 DNA-Polymerase gegeben, gemischt und anschließend 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Die vorbereiteten Eppendorf-Gefäße wurden 1 Minute auf 37°C vorgewärmt. Im Anschluß an die Inkubationszeit des Reaktionsansatzes wurden jeweils 4,5 µl des Ansatzes zu den vorbereiteten Terminations-Ansätzen gegeben, gemischt und 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 5 µl Stop Solution wurde die Polymerasereaktion gestoppt. Die Ansätze wurden anschließend zentrifugiert und bis zur Gelelektrophorese bei -20°C gelagert.

Um einen möglichst großen Trennbereich zu erhalten, wurden zur Trennung der Sequenzier-Reaktionsprodukte 6 %ige Polyacrylamid-Keilgele verwendet. Um die Temperatur während der Elektrophorese konstant zu halten, wurde neben einer Öhrchen-Glasplatte auch eine Thermostat-Deckplatte verwendet. Um ein Anhaften des Sequenziergels an der Öhrchen-Glasplatte zu gewährleisten und an der Thermostat-Deckplatte zu verhindern, wurden die Platten wie folgt behandelt:

Die Thermostat-Deckplatte wurde gründlich mit Spülmittel abgewaschen und mit technischem Aceton abgerieben. Anschließend wurde die Glasplatte mit 0,5 M NaOH abgerieben und gründlich mit Wasser und dest. Wasser abgespült. Mit weichem Papier wurde die Glasplatte trocken gerieben und zweimal mit 5 ml Isopropanol abgerieben. Es wurden dann 5 ml Repel-Silane aufgetragen, verteilt und trocknen gelassen. Nach dem Trocknen wurde die Glasplatte poliert und es wurden erneut 5 ml Repel-Silane aufgetragen, verteilt, trocknen gelassen und poliert. Die Glasplatte wurde mit 25 ml Isopropanol p.a. abgespült, mit weichen Papiertüchern getrocknet und poliert.

Die Öhrchen-Glasplatte wurde mit Spülmittel abgewaschen, gründlich abgespült und mit dest. Wasser nachgespült. Mit Aceton wurde die Öhrchen-Glasplatte getrocknet und anschließend zweimal mit 5 ml Isopropanol abgerieben. 5 ml Binde-Silane-Lösung wurden gleichmäßig auf der Öhrchen-Glasplatte verteilt und trocknen gelassen. Die Öhrchen-Glasplatte wurde anschließend mit einem weichem Papiertuch poliert und mit 5 ml Isopropanol p.a. abgerieben. Anschließend wurde die Öhrchen-Glasplatte mit 25 ml Isopropanol p.a. abgespült, mit weichen Papiertüchern getrocknet und poliert.

An den Längsrändern der Thermostat-Deckplatte wurden je vier unterschiedlich lange Teflon-Abstandshalter so aufgelegt, daß ein in Laufrichtung zunehmender Abstand zwischen Öhrchen-Glasplatte und Thermostat-Deckplatte entstand.

Zu der Gellösung wurden 500 µl APS-Lösung und 60 µl TEMED gegeben und unverzüglich zwischen die Platten gegossen. Dazu wurde die Öhrchen-Glasplatte unten

so an der Thermostat-Deckplatte angesetzt, daß während des Verschiebens der Öhrchen-Glasplatte bis zur Deckung mit der Thermostat-Deckplatte das Gel luftblasenfrei eingefüllt werden konnte. An der oberen Kante der beiden Glasplatten wurde zum Schluß noch ein Taschenformer eingesetzt.

Nach dem Auspolymerisieren des Gels (mind. 1 Stunde) wurde das Gel in die Elektrophoreseapparatur eingespannt und die Puffer-Kammern wurden mit 1-2 l 1 × TBE-Puffer gefüllt. Nach dem Entfernen des Taschenformers wurde für 30 Minuten eine Vorelektrophorese bei einer Thermostateinstellung von 55°C und einer Spannung von 1000 V durchgeführt.

Die Sequenzierproben wurden vor dem Auftragen 5 Minuten bei 95°C denaturiert und anschließend auf Eis bis zum Auftragen gelagert. Vor dem Auftragen der Proben wurden die Taschen mit Puffer gespült. Vier Taschen wurden dann mit 1 - 1,5 µl Probe in der Reihenfolge A, C, G, T beladen. Nach dem Auftragen eines Satzes einer Probe wurde zum Einlaufen des Satzes in das Gel 5 Minuten eine Spannung von 1000 V angelegt. Im Anschluß an den letzten Probeneinlauf in das Gel wurde die Spannung auf 2500 V erhöht. Die Elektrophorese wurde beendet, wenn eine Probe das untere Ende des Gels erreichte. Anschließend wurde die Öhrchen-Glasplatte abgenommen und mit dem anhaftenden Gel zur Fixierung der getrennten Proben in 2 l 10 % (v/v) Essigsäure 60 Minuten gelegt. Nach dem Trocknen des fixierten Gels in einem Trockenschrank (80°C, 2 - 3 Stunden) wurde ein Röntgenfilm direkt auf das getrocknete, abgekühlte Gel gelegt und mit einer zweiten Glasplatte fixiert. Der Film wurde mindestens über Nacht exponiert.

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Chemische Synthesen

#### 5.1.1 S-(4-Nitrobenzyl)-L-cystein

Die Synthese von S-(4-Nitrobenzyl)-L-cystein wurde, wie unter 4.2.1 beschrieben, durchgeführt. Im Gegensatz zu früher durchgeführten Synthesen [Aigner, 1995] fiel das Produkt direkt nach dem Ansäuern mit HCl aus dem Reaktionsansatz aus. Das Kristallisieren über Nacht entfiel. Das beigefarbene Produkt wurde über Nacht im Exsikkator getrocknet.

Es wurde 2 g (7,9 mmol) Produkt erhalten, dies entspricht 79 % d. Th. (Lit.: 68 % d. Th.). Die Analyse des Produktes ( $R_f = 0,68$ ) durch Dünnschichtchromatographie ergab, daß das Produkt keine Kontaminationen enthält.

#### 5.1.2 N-Acetyl-S-(4-nitrobenzyl)-L-cystein

Durch die unter 4.2.2 beschriebene Synthese konnten 0,2 g des gelben Produktes, dies entspricht einer Ausbeute von 58 % d. Th., dargestellt werden.

Die Verunreinigung des Produktes mit Edukt wurde mit Hilfe der HPLC überprüft. Die Analyse ergab, daß das Produkt zu 0,5 % mit Edukt verunreinigt war. Diese Verunreinigung konnte durch Kationenaustauschchromatographie nicht abgetrennt werden.

#### 5.1.3 N,N'-Bis-(3-D-gluconamidopropyl)-desoxycholamid (DesoxyBIGCHAP)

Die unter 4.2.3 beschriebene mehrstufige Synthese ergab für das Zwischenprodukt N,N'-[Iminobis(trimethylen)]-bis-[D-gluconamid] eine Ausbeute von 112,5 g. Von dem gemischten Anhydrid wurden 900 ml einer klaren, gelben Lösung erhalten. Beide Zwischenprodukte wurden vollständig in die weitere Synthese eingesetzt.

Von dem Produkt DesoxyBIGCHAP wurden 49,2 g (58 mmol) dargestellt. Dies entspricht einer Ausbeute von 29 % d. Th. (Lit.: 30 % d. Th.).

Die Reinheit des Produktes ( $R_f = 0,4$ ) wurde dünnschichtchromatographisch überprüft (s. Abb. 5-1). Hierbei zeigte sich eine nicht identifizierbare Verunreinigung ( $R_f = 0,6$ ), die auch in einem käuflichen Referenzprodukt vorhanden war.

Im Verlaufe dieser Arbeit wurden insgesamt ca. 200 g DesoxyBIGCHAP in unterschiedlichen Qualitäten synthetisiert.

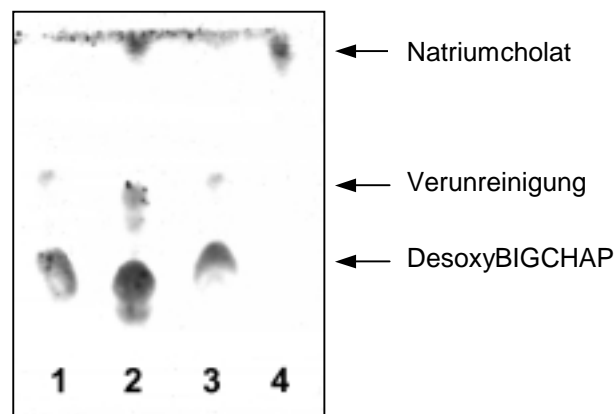


Abb. 5-1: DC-Folie mit Proben von synthetisiertem DesoxyBIGCHAP.  
(Spur 1: Referenz, Spur 2: Rohprodukt, Spur 3: gereinigtes Produkt,  
Spur 4: Natriumcholat).

## 5.2 Aktivitätstests

Zur Bestimmung der kinetischen Parameter der *N*-Acetyl-S-Transferase für verschiedene Substrate (Dr. M.W. Anders, Rochester USA) war es notwendig, die entsprechenden Enzymfraktionen, in Hinsicht auf Konkurrenzreaktionen zur Acetylierung, zu charakterisieren. Hierzu wurden Aktivitätstests für die Enzyme Acetyl-CoA-Hydrolase und Deacetylase etabliert.

Des weiteren wurde der radioaktive Aktivitätstest für die *N*-Acetyl-S-Transferase leicht modifiziert und an neue Pufferbedingungen angepaßt.

### 5.2.1 Bestimmung der Aktivität der *N*-Acetyl-S-Transferase durch einen radioaktiven Test

Der radioaktive Aktivitätstest wurde maßgeblich in zwei Punkten zu dem etablierten Test [Aigner et al., 1995] geändert. Zum einen wurde der Anteil des radioaktiv markierten Acetyl-CoA auf 1/20 im Ansatz reduziert, zum anderen wurde die mobile Phase bei der dünnschichtchromatographischen Trennung geändert.

Die für die kinetischen Messungen verwendete teilgereinigte Enzymlösung enthielt als Detergens CHAPS statt, wie in früheren Arbeiten, DesoxyBIGCHAP. Durch diese Änderung konnte das Reaktionsgemisch nicht mit dem Laufmittel *n*-Butanol, Essigsäure, Wasser (2:1:1) aufgetrennt werden. Diese mobile Phase wurde durch das Gemisch iso-Amylalkohol, Essigsäure, Wasser (3:2:1) ersetzt, so daß die Trennung des Produktes aus dem Reaktionsgemisch möglich war.

Die Abb. 5-2 zeigt dünnschichtchromatographisch aufgetrennte Reaktionsansätze der Substrate **1a-2c** (s. Tabelle 4-1) mit unterschiedlichen Inkubationszeiten. Deutlich sind neben den Produkten, welche aufgrund der Wechselwirkungen mit der stationären Phase unterschiedliche  $R_f$ -Werte aufweisen, mehrere radioaktive Nebenprodukte zu sehen, welche nicht näher charakterisiert wurden.



### 5.1.2 Bestimmung der Aktivität der Desacetylase

Die Desacetylierung von *N*-Acetyl-Cystein-S-Konjugaten (Mercaptursäuren) wird durch eine cytosolische Desacetylase (Aminoacylase) katalysiert. Zur Quantifizierung dieser Rückreaktion wurde die Aktivität der Desacetylase unter den gleichen Bedingungen wie die der *N*-Acetyl-S-Transferase bestimmt. Dazu wurde der unter Abschnitt 4.2.1.2 beschriebene Aktivitätstest leicht modifiziert. Das Substrat *S*-(4-Nitrobenzyl)-L-cystein wurde durch das acetylierte Produkt *N*-Acetyl-S-(4-nitrobenzyl)-L-cystein ersetzt.

Die Quantifizierung erfolgte über eine Eichgerade, für die jeder Meßpunkt vierfach bestimmt wurde. Die Eichgerade ist in Abb. 5-3 dargestellt.

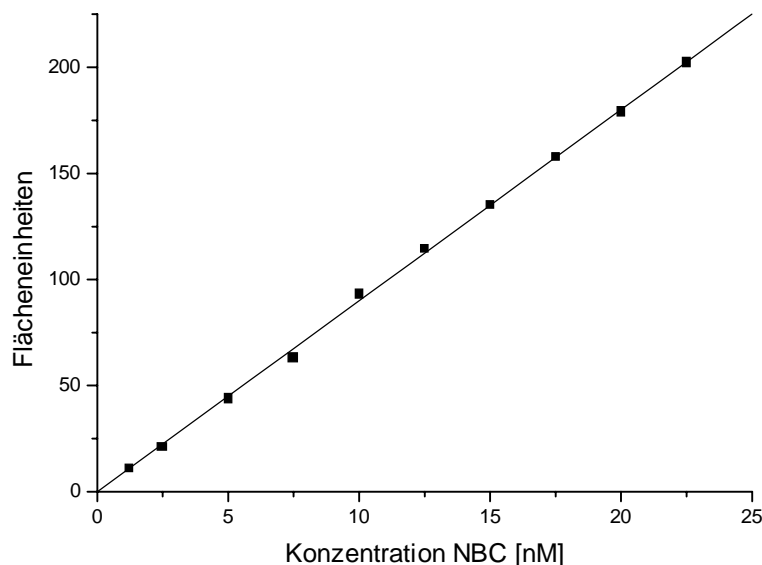


Abb. 5-3: Eichgerade für den Desacetylase-Aktivitätstest.

### 5.1.3 Bestimmung der Aktivität der Acetyl-CoA-Hydrolase

Für die Bestimmung der Aktivität des Enzyms Acetyl-CoA-Hydrolase, welches das Kosubstrat Acetyl-CoA hydrolysiert, wurden die Pufferbedingungen des Aktivitätstests für die *N*-Acetyl-S-Transferase beibehalten, da von Interesse war, inwieweit dieses Enzym den Aktivitätstest der *N*-Acetyl-S-Transferase stört.

Da die Quantifizierung der Aktivität der Acetyl-CoA-Hydrolase über das gebildete CoA erfolgte, eine Trennung der Signale von Acetyl-CoA und CoA unter den Bedingungen des Aktivitätstests für die *N*-Acetyl-S-Transferase aber nicht möglich war, wurde die im Abschnitt 4.2.1.4 beschriebene HPLC gestützte Methode etabliert.

Die Abb. 5-4 zeigt das Elutionsprofil mit den vier Signalen der im Reaktionsansatz vorkommenden Edukte und Produkte. Deutlich ist die Trennung der Signale von CoA ( $R_t = 3,1$  min) und von Acetyl-CoA ( $R_t = 4,8$  min) zu erkennen. Die Verbindungen *S*-(4-Nitrobenzyl)-L-cystein (NBC) und *N*-Acetyl-S-(4-nitrobenzyl)-L-cystein (Acetyl-NBC) eluieren nach 9 bzw. 12,8 Minuten.

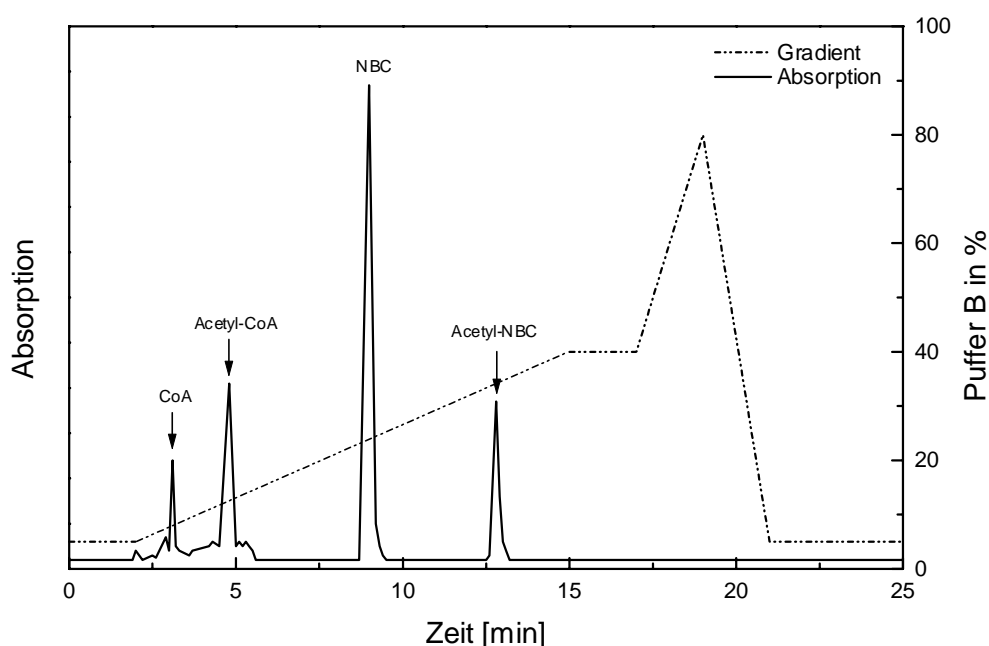


Abb. 5-4: Elutionsprofil des HPLC gestützten Aktivitätstest für das Enzym Acetyl-CoA-Hydrolase. Lösung A: Acetonitril, Puffer B: 17,5 % Methanol, 50 mM Kaliumphosphat, pH 4.



Die Quantifizierung des gebildeten CoA erfolgte über eine Eichgerade, die in Abb. 5-5 dargestellt ist. Für jeden Meßpunkt der Eichgeraden wurden unabhängig voneinander vier Werte bestimmt und gemittelt.

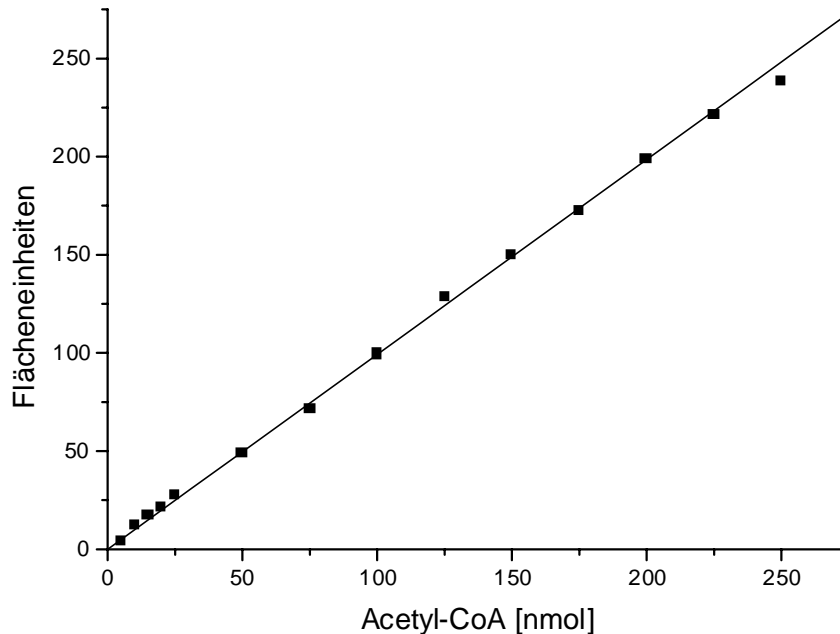


Abb. 5-5: Eichgerade für den Acetyl-CoA-Hydrolase Aktivitätstest.

## 5.2 Solubilisierung der *N*-Acetyl-S-Transferase

Um das cancerogene Detergens DesoxyBIGCHAP bei der Reinigung der *N*-Acetyl-S-Transferase zu ersetzen, wurden verschiedene Detergenzien, nichtdetergente Sulfobetaine in Verbindung mit Detergenzien und Phospholipase C eingesetzt und auf ihre Fähigkeit hin untersucht, die *N*-Acetyl-S-Transferase zu solubilisieren. Außerdem war von Interesse, ein Detergens zu finden, welches in gleichbleibender Qualität erworben werden konnte. Das synthetisierte DesoxyBIGCHAP wies häufig leichte Verunreinigungen auf, welche nicht abgetrennt werden konnten. Ein wichtiges Kriterium bei der Beurteilung der verwendeten Substanzen war der Erhalt der Enzymaktivität in den Puffern.

### 5.3.1 Nichtdetergente Sulfobetaine

Nichtdetergente Sulfobetaine in molaren Konzentrationen zeichnen sich durch ihre Fähigkeit aus, membranständige Proteine bei niedrigen Detergenskonzentrationen zu solubilisieren und eventuell zu stabilisieren [Vuillard, 1991].

Für die Solubilisierungsversuche wurde das zwitterionische Detergens CHAPS (cmc 5 mg/ml) ausgewählt, da es sich nicht störend bei chromatographischen und elektrophoretischen Reinigungsschritten auswirkt und als nichtdenaturierendes Detergens beschrieben ist. Da aus früheren Untersuchungen bereits bekannt war, daß CHAPS in 2,5facher cmc denaturierend auf das Enzym *N*-Acetyl-S-Transferase wirkt

[Aigner, 1995], wurde CHAPS in Verbindung mit nichtdetergenten Sulfobetainen in einfacher cmc eingesetzt. Zum Vergleich wurde DesoxyBIGCHAP in 2,5facher cmc (5 mg/ml) und Puffer ohne Detergens- und NDSB-Zusatz herangezogen.

Entsprechend Abschnitt 4.2.10.1 wurden Mikrosomen mit den entsprechenden Lösungen homogenisiert und gerührt ("Gesamthomogenisat"). Nach Abtrennung der nichtlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation wurde der Überstand auf die Aktivität der *N*-Acetyl-S-Transferase hin untersucht (s. 4.2.1.2). Die Ergebnisse sind in nachstehender Tabelle dargestellt.

Tab. 5-1: Solubilisierung der *N*-Acetyl-S-Transferase mit nichtdetergenten Sulfobetainen.

Probe	Aktivität Gesamthomogenisat [U/ml]	Aktivität Überstand [U/ml]
Ohne Detergens u. NDSB	26,1	8,7
CHAPS	22,5	18,9
CHAPS + NDSB195	16,1	17,0
CHAPS + NDSB201	23,0	22,0
CHAPS + NDSB256	25,0	23,2
DesoxyBIGCHAP (2,5 × cmc)	24,4	19,9

Aus der Tabelle geht hervor, daß das beste Ergebnis mit NDSB195 in Verbindung mit CHAPS erhalten wurde (106 % der Aktivität ist im Überstand). Bei den nichtdetergenten Sulfobetainen NDSB201 und NDSB256 lassen sich 96 % bzw. 93 % der Aktivität des Gesamthomogenisats im Überstand nachweisen. CHAPS in einfacher cmc ohne Zusatz von nichtdetergenten Sulfobetainen zeigt ein ähnliches Ergebnis wie das Detergens DesoxyBIGCHAP in 2,5-facher cmc. Mit CHAPS in einfacher cmc konnten 84 % der Aktivität im Überstand nachgewiesen werden, mit DesoxyBIGCHAP in 2,5facher cmc 81 %.

Für chromatographische Reinigungsschritte eigneten sich die nichtdetergenten Sulfobetaine jedoch nicht, da die Viskosität der Lösung durch den molaren Zusatz stark erhöht wurde. Weiterhin konnte die *N*-Acetyl-S-Transferase aus den Überständen nicht mit Polyethylenglykol sedimentiert werden. Das Enzym ließ sich aus dem Überstand der mit CHAPS solubilisierten Probe fast vollständig fällen (s. 5.4.5).

## 5.2.2 Solubilisierung mit verschiedenen Detergenzien

Sieben verschiedene handelsübliche Detergenzien wurden auf ihre Fähigkeit hin untersucht, *N*-Acetyl-S-Transferase aus Mikrosomen zu solubilisieren. Zusätzlich wurde die Löslichkeit des Enzyms unter Hochsalzbedingungen (1 M NaCl bzw. KCl) untersucht. Die Detergenzien waren gelöst in TDG-Puffer, pH 7,3. Aufgrund der Ergebnisse des Abschnitts 5.3.1 wurde CHAPS in einfacher cmc eingesetzt, alle übrigen Detergenzien in 2,5facher cmc, da durch die einfache cmc kaum aktive *N*-Acetyl-S-Transferase aus den Mikrosomen gelöst wurde.

Die Ergebnisse des Aktivitätstests gehen aus der Tabelle 5-2 hervor. Zum Vergleich wurde zusätzlich DesoxyBIGCHAP eingesetzt.

Tab. 5-2: Solubilisierung der *N*-Acetyl-S-Transferase mit verschiedenen Detergenzien.

Detergens* in TDG-Puffer, pH 7,3	Aktivität [U/ml]		Gelöste Aktivität in Prozent
	Homogenisat	Überstand	
CHAPS	24,5	20,8	85
DesoxyBIGCHAP	27,6	22,9	83
KCl	22,6	11,7	52
NaCl	18,4	11,6	63
Niccol	17,6	6,7	38
Nonidet P40	12,5	7,0	56
Triton X-100	18,3	8,3	45
Triton X-114	16,1	10,1	63
Tween 20	14,5	4,5	31
Tween 80	12,7	6,4	50

\* In 2,5-facher cmc eingesetzt; CHAPS in einfacher cmc

Die Ergebnisse in Tab. 5-2 zeigen, daß sich CHAPS, entgegen früheren Ergebnissen [Aigner, 1995], aufgrund der gelösten Aktivität, als geeigneter Ersatz für das cancerogene DesoxyBIGCHAP für die Solubilisierung von *N*-Acetyl-S-Transferase aus Mikrosomen eignet.

### 5.2.3 Solubilisierung mit Triton X-114

Triton X-114 fällt aufgrund seines Wolkenpunktes bei 20°C aus. Oberhalb dieser Temperatur bilden sich zwei Phasen: Eine wäßrige- und eine detergensreiche Phase. Diese Eigenschaft wird zur Separierung von peripheren und integralen Membranproteinen genutzt [Bordier, 1981]. Hierzu werden die Proteine bei 4°C gelöst und die Lösung wird anschließend auf 30°C erwärmt.

Entsprechend Abschnitt 4.2.9.3 wurden Mikrosomen mit Triton X-114 gelöst. Aus der Solubilisierung der Mikrosomen resultierten eine Detergensphase, eine wäßrige Phase (Überstand) und ein Sediment. Das Volumen der Detergensphase betrug 8 ml, das der wäßrigen Phase 12 ml (ausgehend von 20 ml Gesamtvolumen). Die Tabelle 5-3 zeigt, daß ca. 70 % der Aktivität in der Detergensphase zu finden ist. Ca. 30 % der Aktivität verbleibt in dem Sediment.

Tab. 5-3: Aktivitäten in den Triton X-114 Phasen.

Probe	Vol.-Akt. [U/ml]	Gesamt-Akt. [U]
Homogenisat	16,9	337,4
Wäßr. Phase	0,4	4,8
Detergensphase	26	208

Daß sich die Aktivität hauptsächlich in der Detergensphase findet, läßt den Schluß zu, daß es sich bei der *N*-Acetyl-S-Transferase um ein integrales Membranprotein handelt.

Die wäßrige Phase und die Detergensphase wurden mit Hilfe der 2 D-Elektrophorese entsprechend Abschnitt 4.2.5.2 analysiert, anschließend auf PVDF-Membranen transferiert und mit Coomassie Brilliant Blau gefärbt.

Die Abbildungen 5-6 und 5-7 geben die auf die Membranen transferierten 2 D-Gele wieder. Deutlich sind Unterschiede im Muster der angefärbten Proteine beider Phasen zu erkennen. Insbesondere im Bereich von 68 kDa und auch 34 kDa läßt sich eine gute Trennung der Proteine beobachten.

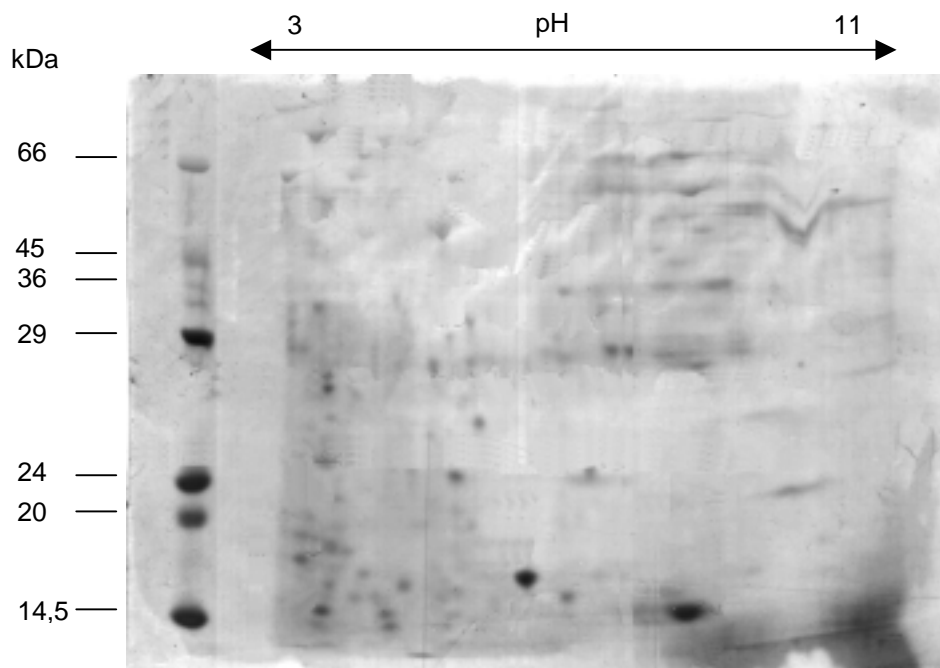


Abb. 5-6: Elektroblot eines 2 D-Gels der wäßrigen Phase.

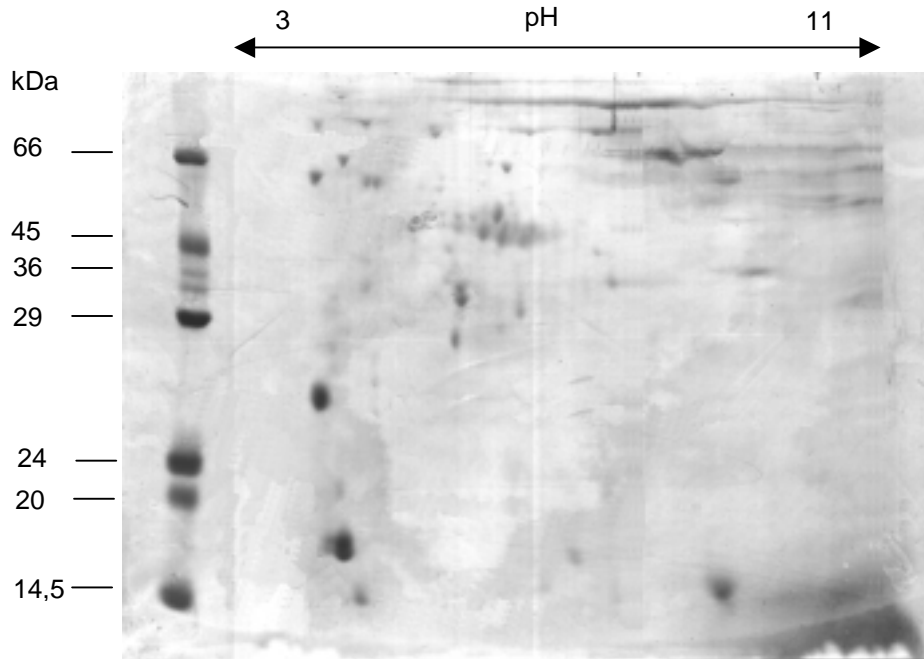


Abb. 5-7: Elektrophoretogramm eines 2 D-Gels der Detergensphase.

Die augenfälligsten Unterschiede lassen sich im sauren Bereich der Elektrophoretogramme erkennen. Bei der Detergensphase (Abb. 5-7) ist zwischen 24 und 29 kDa klar ein angefärbtes Protein zu sehen, welches auf dem Blot der wässrigen Phase fehlt. Im Bereich von pH 5 zeigt sich in der Detergensphase eine starke Separierung von Proteinen, die eine Größe von ca. 34 kDa haben. Weiterhin lassen sich in dieser Phase unterhalb von 66 kDa zwei angefärbte Proteine ausmachen, die auf dem Elektrophoretogramm der wässrigen Phase nur schwach angefärbt wurden.

#### 5.2.4 Solubilisierung mit Phospholipase C

Membranproteine, welche über eine an ihrem C-Terminus lokalisierte Glycosyl-Phosphatidylinositol-Gruppe in der Membran verankert sind, lassen sich mit Hilfe des Enzyms Phospholipase C (durch Abspalten der Gruppe von dem Protein) von der Membran lösen.

Um zu prüfen, ob das Enzym *N*-Acetyl-S-Transferase über einen Glycosyl-Phosphatidylinositol-Anker an die Membran gebunden ist, wurden Mikrosomen, entsprechend Abschnitt 4.2.9.4, mit Phospholipase C behandelt.

Tabelle 5-4 zeigt die Aktivitäten des Gesamthomogenisates bzw. Überstandes nach der Inkubation der Mikrosomensuspension für 3 Stunden bei 30°C.

Tab. 5-4: Solubilisierung mit Phospholipase C.

Probe	Aktivität Gesamthomogenisat [U/ml]	Aktivität Überstand [U/ml]
Ohne Phospholipase C	17,8	0,8
0,5 U Phospholipase C	4,2	0,02
1 U Phospholipase C	3,8	0,07
1,5 U Phospholipase C	3,9	0,08
2 U Phospholipase C	4,2	0,1

Die Suspension der Mikrosomen hatte vor der Inkubation mit bzw. ohne Phospholipase C bei 30°C eine Aktivität von 26,6 U/ml, der Überstand von 2,9 U/ml.

Es läßt sich eine leichte Steigerung der Aktivität in dem Überstand der Proben feststellen, diese Steigerung liegt jedoch im Fehlerbereich des Aktivitätstests. Verglichen mit der Aktivität vor der Inkubation läßt sich sowohl im Homogenisat als auch im Überstand ein Aktivitätsverlust feststellen. Dieser ist mit Zusatz von Phospholipase C am höchsten (Verlust über 75 %).

Es läßt sich zusammenfassen, daß durch Phospholipase C keine Aktivität freigesetzt wird.

## 5.4 Teilreinigung der *N*-Acetyl-S-Transferase

### 5.4.1 Präparation der mikrosomalen Fraktion aus Schweinenieren

Aus 652 g Nieren-Cortex wurde durch Homogenisieren in 350 ml SD-Puffer 800 ml Homogenisat erhalten, welches frei von größeren Gewebeteilen war. Nach der Zentrifugation bei 680 g wurden 280 ml Überstand erhalten. Das Gewebesediment wurde erneut in 350 ml SD-Puffer homogenisiert und anschließend zentrifugiert. Der daraus resultierende Überstand (300 ml) wurde mit dem Überstand der ersten Zentrifugation vereinigt (580 ml) und anschließend wurde die lysosomale Fraktion durch Zentrifugation abgetrennt. Das Volumen des so gewonnenen Überstandes betrug 440 ml. Die anschließende Ultrazentrifugation ergab Rohmikrosomen in einer Ausbeute von 24,8 g (Feuchtgewicht). Nach dem Waschen der Rohmikrosomen mit 150 mM Tris-HCl, pH 8,0 und anschließender Ultrazentrifugation wurden 22,6 g Mikrosomen erhalten.

### 5.4.2 Präparation von PEG-Sediment

2 g Mikrosomen wurden entsprechend Abschnitt 4.2.10.2 resuspendiert und in CHAPS-haltigem Puffer gelöst. Durch Zugabe einer 50 %igen PEG-6000 Lösung bis zu einer Endkonzentration von 10 % konnten 0,5 g PEG-Sediment präpariert werden. Wurde anstatt CHAPS das Detergens DesoxyBIGCHAP zur Solubilisierung der Membranproteine aus den Mikrosomen verwendet, war eine Endkonzentration des Polyethylenglykols von 20 % nötig, um die Aktivität vollständig zu fällen. Die Ausbeute an PEG-Sediment betrug, ausgehend von 2 g Mikrosomen, 1,3 g. Bezogen auf die eingesetzte Menge an Mikrosomen war die Ausbeute an Sediment in DesoxyBIGCHAP-

haltiger Lösung deutlich größer als bei der Solubilisierung mit CHAPS-haltigem Puffer. Die Aktivität der *N*-Acetyl-S-Transferase wurde jedoch bei beiden Detergenzien fast vollständig aus der Proteinlösung gefällt. Dies deutet darauf hin, daß im Falle der Solubilisierung mit CHAPS-haltigem Puffer weniger unerwünschte Proteine mitgefällt werden.

#### 5.4.3 FPLC-DEAE Blue Anionenaustauschchromatographie

Bei diesem Säulenmaterial sind der Farbstoff Cibacron blue F3GA- sowie Diethylaminoethylgruppen an eine Bio-Gel Agarosematrix gebunden. Dadurch erhält das Säulenmaterial sowohl Affinitäts- als auch Ionenaustauschereigenschaften.

1 g PEG-Sediment wurde in 5 ml TDG-Puffer, pH 7,8 aufgenommen, sterilfiltriert und auf die Säule aufgetragen. Nach dem Auftragen wurde im aufsteigenden KCl-Gradienten (1 M) eluiert. Im Anschluß daran erfolgte eine Stoßelution mit TDGC-Puffer, pH 7,8, der 1 M KCl enthielt.

Die nichtbindende Fraktion (25 ml) und 40 Fraktionen à 1 ml wurden gesammelt. Das Elutionsprofil ist in Abb. 5-8 dargestellt. Hierbei zeigt sich, daß, wie bei früheren Untersuchungen, zwei Signale auftreten. Das erste Signal erscheint im aufsteigenden KCl-Gradienten, das zweite Signal tritt während der Stoßelution mit CHAPS-haltigem Puffer auf.

Im Auftrag befanden sich 42,7 U, in der nichtbindenden Fraktion fanden sich 10 U, d.h. ca. 23 % der Aktivität wurden nicht an das Säulenmaterial gebunden. Im ersten Signal konnten 14,2 U (33,3 %), im zweiten Signal 14,9 U (35 %) nachgewiesen werden. Im zweiten Signal findet sich auch die höchste spezifische Aktivität. Bezogen auf Fraktion 34 konnte eine ca. 6-fache Reinigung erzielt werden. Es wurde nur ca. 1/3 der aufgetragenen Aktivität im zweiten Signal, welches der Stoßelution mit CHAPS-haltigem Puffer entspricht, eluiert.

In Abbildung 5-9 ist ein SDS-Gel mit Proben des Auftrages des Signals 1 und 2 dargestellt. Hier zeigt sich deutlich, daß sich die Proteinzusammensetzungen der beiden Signale nicht signifikant unterscheiden. Die unterschiedliche Intensität ist auf einen unterschiedlichen Proteingehalt der Proben zurückzuführen. Das Ergebnis ist vergleichbar mit früheren Experimenten [Aigner, 1995].

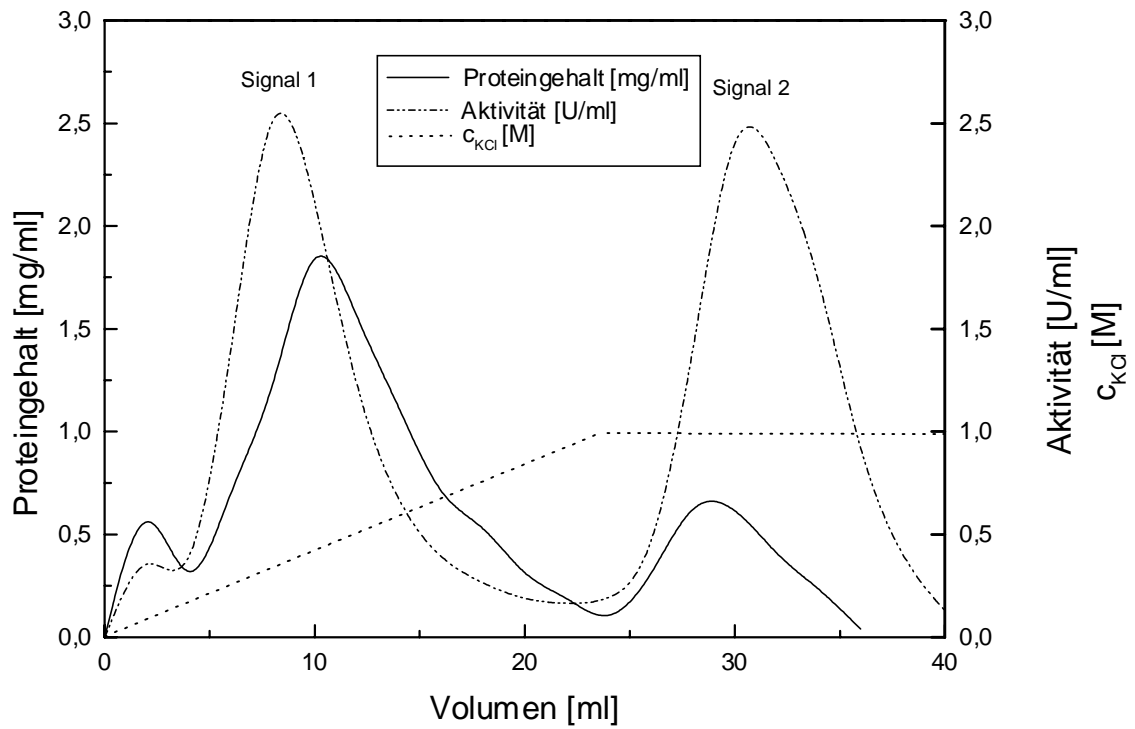


Abb. 5-8: Elutionsprofil der FPLC-DEAE blue Anionenaustauschchromatographie.

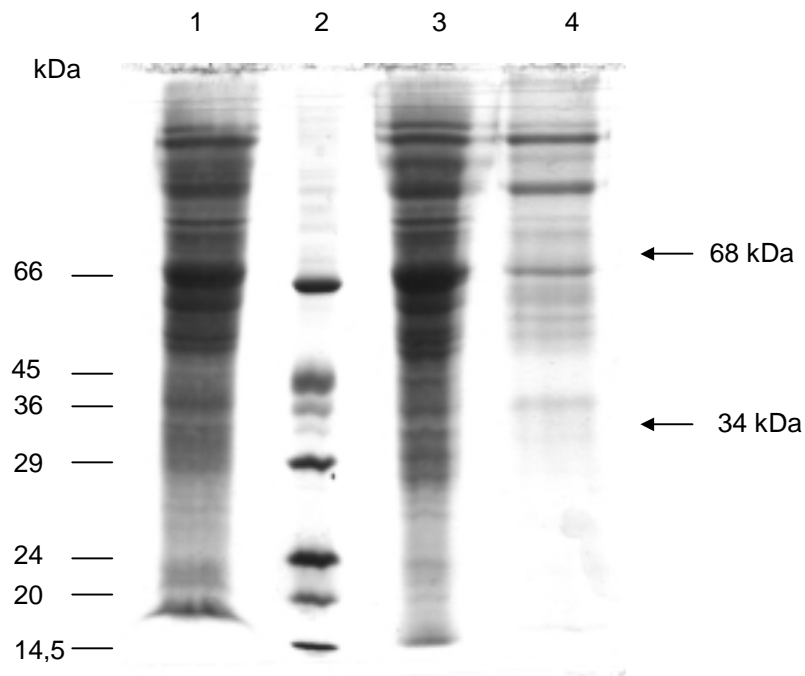


Abb. 5-9: SDS-PAGE mit Proben aus der FPLC-DEAE blue Anionenaustauschchromatographie (Spur 1: Auftrag, Spur 2: SDS-7 Größenstandard, Spur 3: Signal 1, Spur 4: Signal 2).



#### 5.4.4.1 FPLC-Resource Q-Anionenaustauschchromatographie

Bei dem Resource Q-Säulenmaterial handelt es sich um einen starken Anionenaustauscher mit einer quaternären Ammoniumgruppe als Ligand, gekoppelt an eine Polystyren/Divinylbenzol-Matrix. Das Säulenmaterial zeichnet sich durch einen geringen Rückdruck bei hoher Flußrate (1-60 ml/min), einer hohen Bindekapazität ( $\leq 150$  mg Protein/Säule) und einem großen Anwendungsbereich aus.

Aufgrund der hohen Bindekapazität und des Säulenmaterials wurde der Mikrosomenaufschluß, nach der Abtrennung von unlöslichen Bestandteilen, direkt auf die Säule aufgetragen.

18 ml eines sterilfiltrierten Mikrosomenaufschlusses (s. 4.2.10.2) wurden in 6 Schritten à 2 ml auf die Säule aufgetragen. Eluiert wurde im nichtlinearen KCl-Gradienten (0-1 M). Die Plateaus wurden manuell eingefügt. Es wurden 120 Fraktionen à 1 ml gesammelt.

Das Elutionsprofil ist in Abbildung 5-10 dargestellt. Es zeigt 6 Signale, welche bei KCl-Konzentrationen von 150, 200, 320, 440, 550 und 670 mM auftreten. Im Auftrag befanden sich 313,7 U. In der nichtbindenden Fraktion konnten 13 U (4 % des Auftrages) nachgewiesen werden.

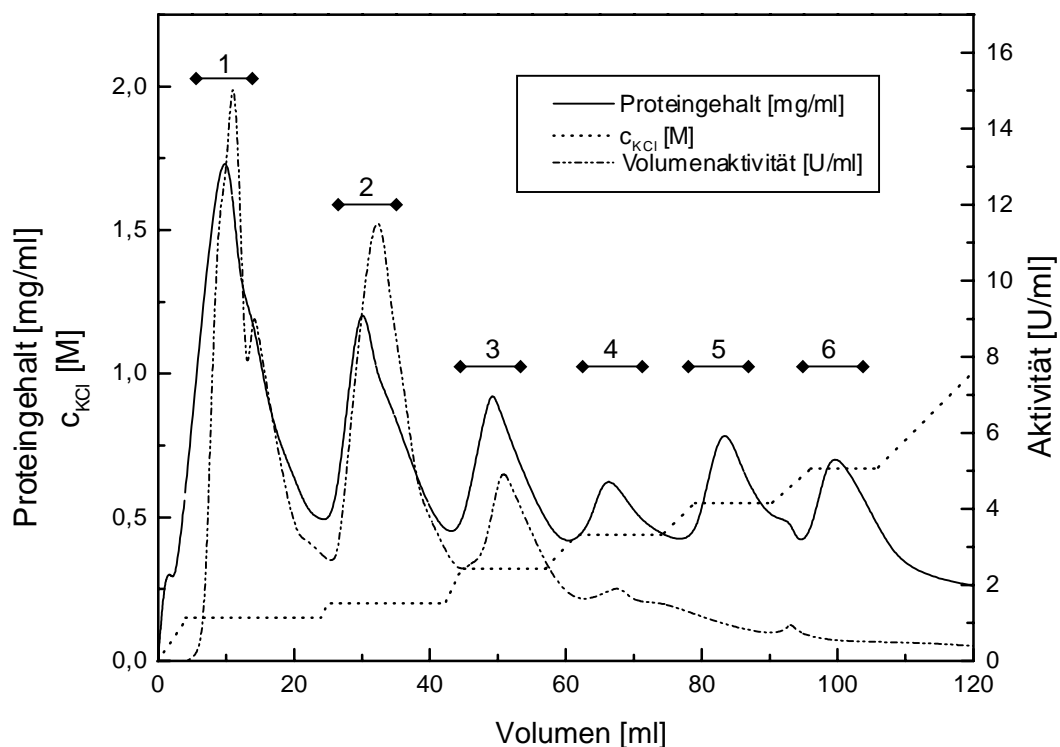


Abb. 5-10: Elutionsprofil der Resource Q-Anionenaustauschchromatographie.

Eine Übersicht über die Fraktionen mit den höchsten spezifischen Aktivitäten gibt Tabelle 5-5.

Tab. 5-5: Übersicht über die Aktivitäten bei der Resource Q-Anionenaustauschchromatographie.

Probe	Aktivität [U/ml]	Vol. [ml]	Ges.- Aktiv. [U]	Proteinkonz. [mg/ml]	Spez.-Aktiv. [U/mg]	Reinigungs- faktor
Auftrag	17,4	18	313,9	13,1	1,3	1
Durchlauf 1	0,7	45	10,4	0,6	1,1	0,8
Durchlauf 2	0,2	14	2,7	0,5	0,5	0,4
Fraktion 9	12,2	1	12,2	1,9	6,6	5,0
Fraktion 11	16,3	1	16,3	1,6	10,0	7,6
Fraktion 15	8,3	1	8,3	0,9	9,4	7,1
Fraktion 32	13,4	1	13,4	1,0	13,4	10,1

Die höchste spezifische Aktivität ist im Signal 2 zu finden. Insgesamt wurden im Signal 2 ca. 1/3 (32,4 %) der gesamten Aktivität eluiert. Die Fraktion mit der höchsten spezifischen Aktivität und dem größten Reinigungsfaktor ist Fraktion 32.

Zur Analyse der einzelnen Signale wurden aus den Signalen 1, 2 und 3 Fraktionen mit den höchsten spezifischen Aktivitäten in einer Amicon-Druckdialysezelle eingengt und durch zweidimensionale Gelelektrophorese aufgetrennt.

#### 5.4.4.2 Elektoblots der eingengten Proben der Resource Q-Anionenaustauschchromatographie

Aus den eingengten Proben der Resource Q-Anionenaustauschchromatographie wurden jeweils ca. 400 µg Protein mit TCA (s. 4.2.4.1) gefällt und auf die Gele aufgetragen. Nach der zweidimensionalen Gelelektrophorese (s. 4.2.5.2) wurden die Gele auf PVDF-Membranen transferiert und im Anschluß daran mit Coomassie Brilliant Blau gefärbt.

Die Muster der angefärbten Proteine auf den Elektoblots zeigen bei den verschiedenen Proben deutliche Unterschiede. Der Elektoblot des Signals 3 (Abb. 5-13) zeigt bei ca. 34 kDa ein diffus angefärbtes Protein, das auf dem Elektoblot der Signale 1 (Abb. 5-11) und 2 (Abb. 5-12) in zwei Proteine aufgetrennt werden konnte. Da in früheren Arbeiten die Molmasse der *N*-Acetyl-S-Transferase mit 34 kDa bzw. mit 68 kDa (Dimer) bestimmt wurde, wurden Proteine, welche in der Probe des Signals 2 in diesen Größenbereichen angefärbt waren, aus der Membran mit einem Skalpell ausgeschnitten und sequenziert. Die sequenzierten Proteine sind in Abb. 5-5 mit einem Kreis markiert.

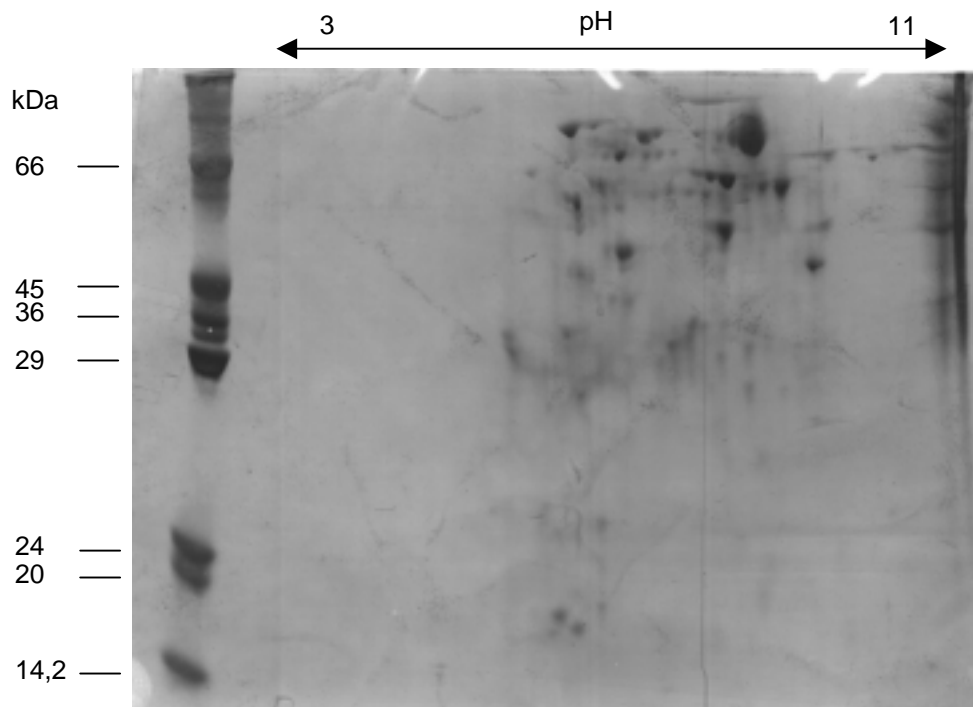


Abb. 5-11: Elektroblot des Signals 1 aus der Resource  
Q-Anionenaustauschchromatographie.

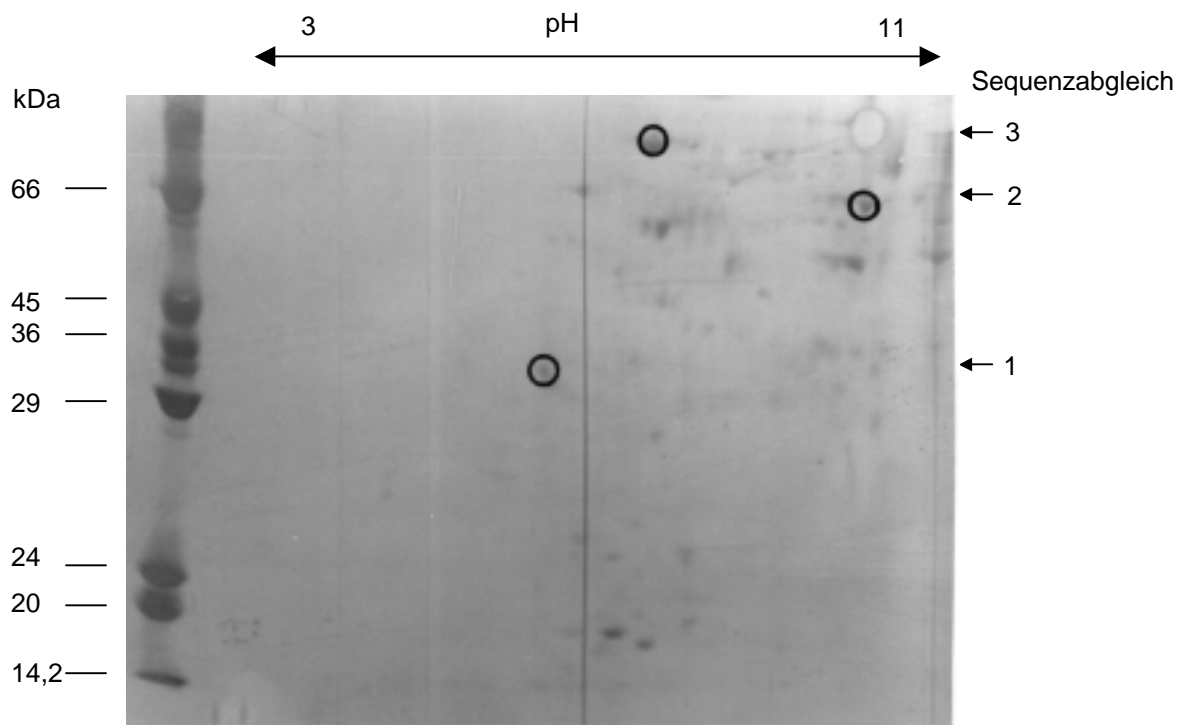


Abb. 5-12: Elektroblot des Signals 2 der Resource  
Q-Anionenaustauschchromatographie (markiert sind sequenzierte  
Proteine).

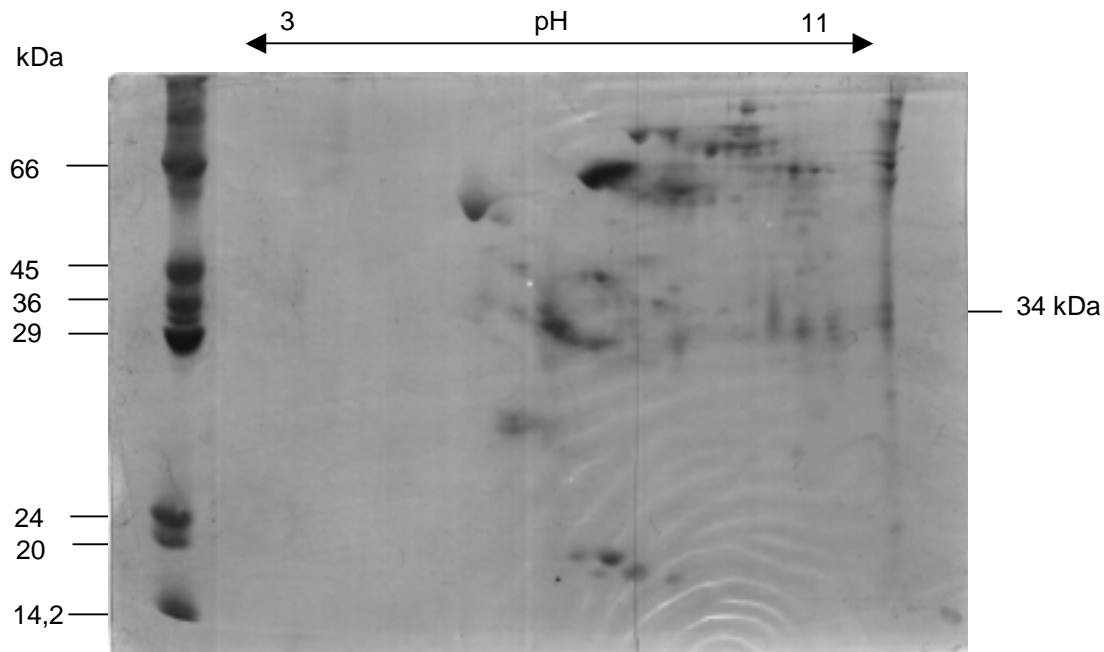


Abb. 5-13: Elektrobplot des Signals 3 der Resource  
Q-Anionenaustauschchromatographie.

Der Datenbankabgleich mit den erhaltenen Sequenzen ergab über den Suchalgorithmus BLASTP eine Homologie zu den Proteinen grp58, Topomyosin und zu einem IgG-bindendem Protein.

#### Sequenzabgleich 1 (Teilsequenz Tropomyosin)

	1				5				10	
Sequenzanalyse	S	L	E	C	V	K	R	K	M	Q
	6				10				15	
Datenbankabfrage	S	L	E	A	V	K	R	K	I	Q

Das sequenzierte Peptid zeigt eine 80 %ige Übereinstimmung mit dem Protein Tropomyosin, welches in einem calciumunabhängigen Prozeß eine wichtige Rolle bei der Steuerung der Muskelkontraktion spielt. Weiterhin ist es ein Bestandteil des Cytoskeletts.

#### Sequenzabgleich 2 (Teilsequenz grp58)

	2			5		8	
Sequenzanalyse	D	V	L	E	L	T	D
	2			5		8	
Datenbankabfrage	D	V	L	E	L	T	D

Diese Peptidteilsequenz stimmt zu 100 % mit einem Motiv von membrangebundenen Proteinen überein. Es findet sich in einem von Streß induzierten Protein, dem sog. grp58. Diese Teilsequenz findet sich aber auch in der mittleren und langen Kette der Carnithin-Acetyltransferase I aus Ratte.

## Sequenzabgleich Signal 3 (Teilsequenz BIP)

	1			5			9		
Sequenzanalyse	E	E	E	D	K	K	E	D	V
	1			5			9		
Datenbankabfrage	E	E	E	D	K	K	E	D	V

Diese Teilsequenz stimmt zu 100 % mit einem IgG-bindenden Protein der schweren Kette überein. Dieses Protein ist im endoplasmatischen Reticulum lokalisiert und gehört zu der Klasse der Chaperone.

#### 5.4.5 Affigel blue Affinitätschromatographie

Im Batch-Verfahren wurden 4 ml Proteinlösung (gelöstes PEG-Sediment, s. 4.2.10.2) mit 4 ml Säulenmaterial 2 Stunden bei 4°C geschüttelt. Nachdem das Material in eine Säule gefüllt wurde, wurde mit 24 ml (6-faches Säulenvolumen) Puffer gewaschen.

Eluiert wurde mit 10 ml eines Puffers, der 1 mM CoA enthielt. Es wurden 10 Fraktionen à 0,5 ml gesammelt, die restlichen 5 ml bildeten eine Fraktion. Lediglich in Fraktion 3 ließ sich eine geringe Aktivität nachweisen.

Die Eluat-Fraktionen wurden vereinigt und mit Hilfe von Centricon-10 Ultrakonzentratoren auf 200 µl eingeeengt.

Das Retentat wurde auf ein 7,5 %iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und im Anschluß an die Elektrophorese geblottet. Eine Spur des Elektroblottes wurde von dem Gesamtblot abgetrennt und mit gegen *N*-Acetyl-S-Transferase gerichteten Antikörpern immungefärbt (s. 4.2.8.3). Der Rest des Elektroblottes wurde mit Coomassie Brilliant Blau gefärbt.

Der Blot ist in Abbildung 5-14 dargestellt. Zu erkennen sind mehrere Proteinbanden. Interessant sind die markierten Bereiche bei 34 kDa und 68 kDa. In diesen Bereichen konnte bei ca. 68 kDa eine Bande mit Hilfe der Antikörper stark und im Bereich von ca. 34 kDa eine Bande leicht gefärbt werden. Die entsprechenden Banden wurden aus dem mit Coomassie gefärbten Elektroblot ausgeschnitten und sequenziert.



Auch ist die Sequenz homolog zu dem Proteinkinase C Inhibitor aus Mensch. Jedoch ist auch hier trotz der guten Übereinstimmung festzustellen, daß es sich nicht aufgrund der Positionen der übereinstimmenden Aminosäuren, sowohl in dem sequenzierten Protein als auch in dem der Datenbankabfrage, um die gleichen Proteine handelt.

Auch für diese Aminosäuren lassen sich keine Übereinstimmungen finden, die auf konservierte Domänen hinweisen.

## **5.5 Bestimmung kinetischer Konstanten der *N*-Acetyl-S-Transferase**

### **5.5.1 Präparation einer Enzym-Lösung für kinetische Untersuchungen**

Wie in Abschnitt 4.2.11.1 beschrieben, wurden ausgehend von 2 g Mikrosomen 0,61 g PEG-Sediment präpariert. Das Sediment wurde in 25 ml TDGC-Puffer, pH 7,4 aufgenommen und in Portionen à 1,5 ml abgefüllt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20°C bis zur Verwendung aufbewahrt.

Für die kinetischen Untersuchungen war es wichtig, eine Proteinfraction zu erhalten, welche möglichst frei von störenden Aktivitäten (Acetyl-CoA-Hydrolase und Desacetylase) war. Da der Aktivitätstest für die *N*-Acetyl-S-Transferase auf der Acetylierung der Substrate beruht, würde die Rückreaktion, d.h. die Desacetylierung der Substrate zu falschen Meßergebnissen führen. Bei Anwesenheit des Enzyms Desacetylase würde somit die Menge an acetyliertem Produkt vermindert werden.

Durch ein neu etabliertes Teilreinigungsverfahren (s. 4.2.11.1) konnte vollständig auf chromatographische Schritte verzichtet werden. Nach dem Homogenisieren wurden große Gewebeteile durch Zentrifugation bei  $300 \times g$  und die lysosomale Fraktion durch Zentrifugieren bei  $800 \times g$  abgetrennt. Rohmikrosomen wurden aus dem resultierenden Überstand bei  $100.000 \times g$  sedimentiert. Zur Abtrennung basischer Proteine wurden die Rohmikrosomen mit Tris, pH 8,0 gewaschen und erneut bei  $100.000 \times g$  sedimentiert. *N*-Acetyl-S-Transferase-Aktivität wurde mit CHAPS-haltigem TDG-Puffer, pH 7,3 aus den Mikrosomen gelöst und unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation bei  $100.000 \times g$  abgetrennt. Aus der resultierenden Lösung wurde mit Polyethylenglykol bei einer Endkonzentration von 10 % (w/v) die Aktivität gefällt und anschließend durch Zentrifugation bei  $20.000 \times g$  sedimentiert. Das Sediment wurde mit 10 %-iger Polyethylenglykollösung gewaschen und erneut sedimentiert. Bis zur Weiterverarbeitung wurde das Polyethylenglykol-Sediment bei -20°C aufbewahrt.

Um die mikrosomale und die Enzymfraktion zu charakterisieren, wurden die Aktivitäten der Enzyme *N*-Acetyl-S-Transferase, Acetyl-CoA-Hydrolase und Desacetylase bestimmt, und der Proteingehalt der Enzymfraktion wurde durch Totalhydrolyse ermittelt.

Der Proteingehalt der mikrosomalen Fraktion betrug 510 µg/ml, der der Enzymfraktion 230 µg/ml. Die Aktivität der Desacetylase konnte in der teilgereinigten Fraktion nicht mehr nachgewiesen werden. Die Aktivität der Acetyl-CoA-Hydrolase konnte um ca. 70 % reduziert werden und die *N*-Acetyl-S-Transferase um den Faktor 4 angereichert werden.

Eine Übersicht über die Teilreinigung der *N*-Acetyl-S-Transferase gibt das Diagramm auf Seite 89 (Abb. 5-15)

Tab. 5-6: Charakterisierung der mikrosomalen- und teilgereinigten Enzymfraktion.

Enzyme	Mikrosomale Fraktion Spez. Aktivität [U/mg]	Enzymfraktion spez. Aktivität [U/mg]
NAcT	20,7	86,5
Acetyl-CoA-Hydrolase	58,8	20,9
Desacetylase	1,9	-



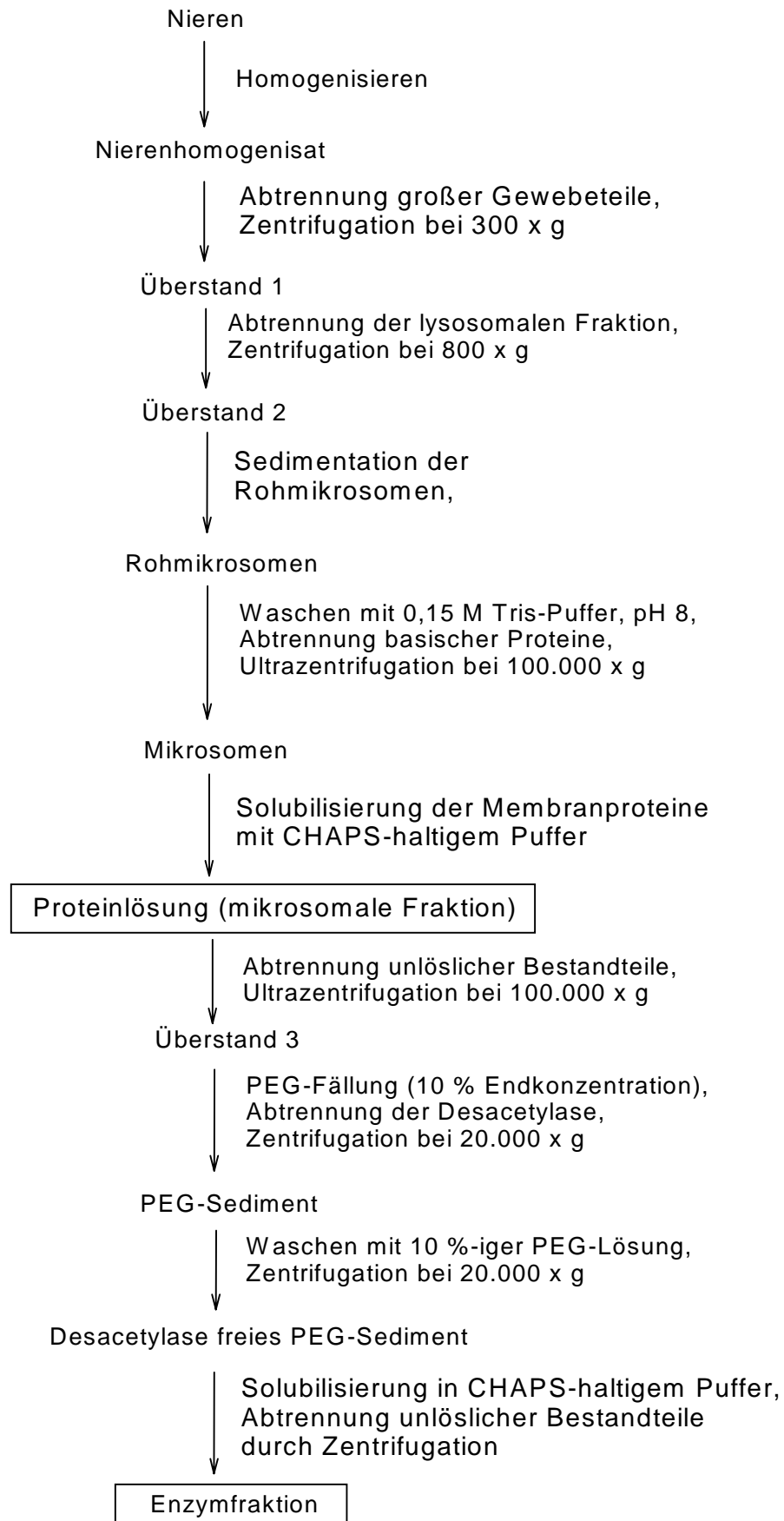


Abb. 5-15: Übersicht über die Teilreinigung der *N*-Acetyl-S-Transferase für kinetische Untersuchungen. Markierte Fraktionen wurden durch Aktivitätsbestimmung für NAcT, Desacetylase und Acetyl-CoA-Hydrolase näher charakterisiert.

### 5.5.2 Temperaturstabilität der *N*-Acetyl-S-Transferase

Da es für die kinetischen Untersuchungen notwendig war, die teilgereinigte Fraktion bis zu einer Stunde auf Eis zu lagern, wurde untersucht, inwieweit die Aktivität der Enzymfraktion bei 4°C abnimmt.

Abb. 5-16 zeigt den Verlauf der Aktivität bei Lagerung bei 4°C über einen Zeitraum von 72 Stunden. Es zeigte sich, daß die Aktivität der *N*-Acetyl-S-Transferase nach einer Stunde um 3,7 % abnahm. Über einen Zeitraum von 72 Stunden nahm die Aktivität um ca. 30 % ab.

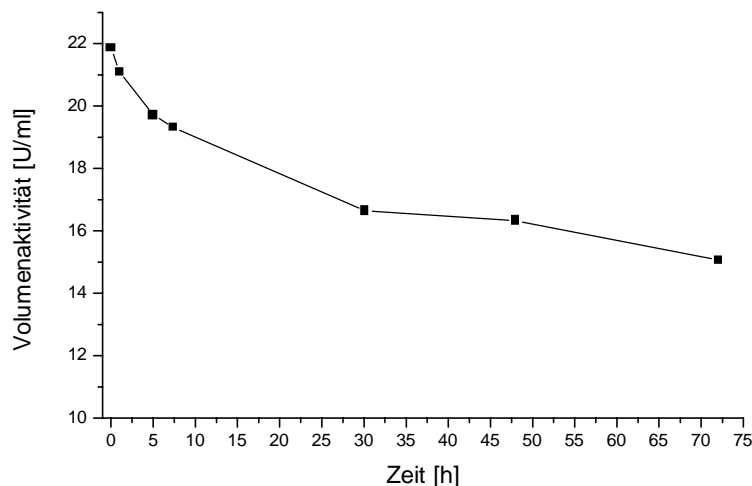


Abb. 5-16: Abnahme der Aktivität bei 4°C.

Weiterhin wurde untersucht, welches Temperaturoptimum die *N*-Acetyl-S-Transferase hat. Abb. 5-17 zeigt die Aktivität des Enzyms bei unterschiedlichen Temperaturen. Aus der Abbildung ist zu entnehmen, daß bei 52°C die Aktivität am höchsten ist, d.h. bei dieser Temperatur hat die *N*-Acetyl-S-Transferase unter den eingestellten Pufferbedingungen ein Optimum.

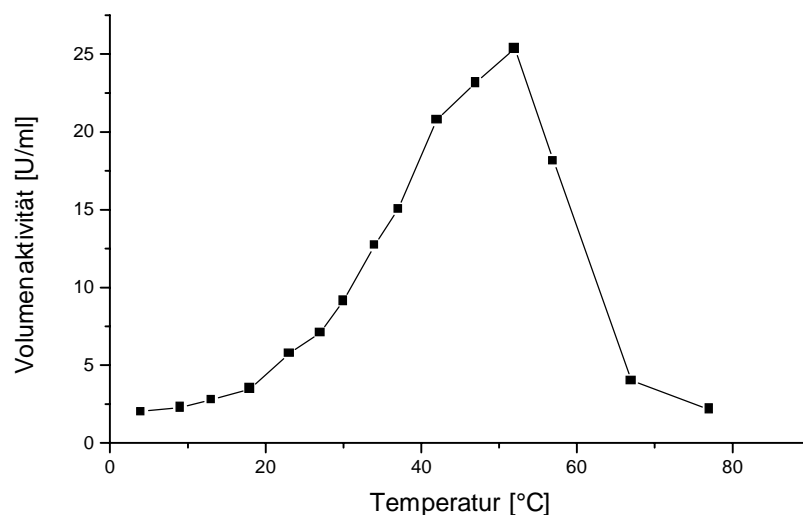


Abb. 5-17: Temperaturoptimum der *N*-Acetyl-S-Transferase.

### 5.5.3 Bestimmung der kinetischen Größen $K_m$ , $V_{max}$ und $V_{max} / K_m$

Für die in Abschnitt 4.2.11.2 genannten Cystein-S-Konjugate wurden die Michaelis-Menten-Konstante ( $K_m$ ), die maximale Geschwindigkeit ( $V_{max}$ ) und der Quotient aus  $V_{max} / K_m$ , welcher ein Maß für die Effizienz der Enzymkatalyse ist, bestimmt. Ausgehend von der unter 4.2.11.1 beschriebenen und charakterisierten, teilgereinigten Enzymfraktion wurde für alle Cystein-S-Konjugate der zeitliche Verlauf der Produktbildung bestimmt. Hierzu wurden die Substrate in einer Konzentration von 1 mM in den radioaktiven Aktivitätstest eingesetzt. Inkubiert wurde bis zu 60 Minuten, je nach eingesetztem Substrat. Die Abbildungen 5-18 bis 5-24 zeigen die zeitlichen Verläufe der Produktbildungen der einzelnen Substrate. Substrat 2c zeigte keine meßbare Produktbildung.

Ausgewertet wurden die Aktivitätstests densitometrisch, in dem ein Röntgenfilm mit den auf einer DC-Folie aufgetrennten Proben und einem Standard exponiert wurde. Die Expositionszeit betrug abhängig von dem Substrat bis zu einem Monat. Durch Vergleich mit dem Standard konnte die Produktbildung, durch digitales Erfassen des Röntgenfilms und computergestützte Auswertung, bestimmt werden.

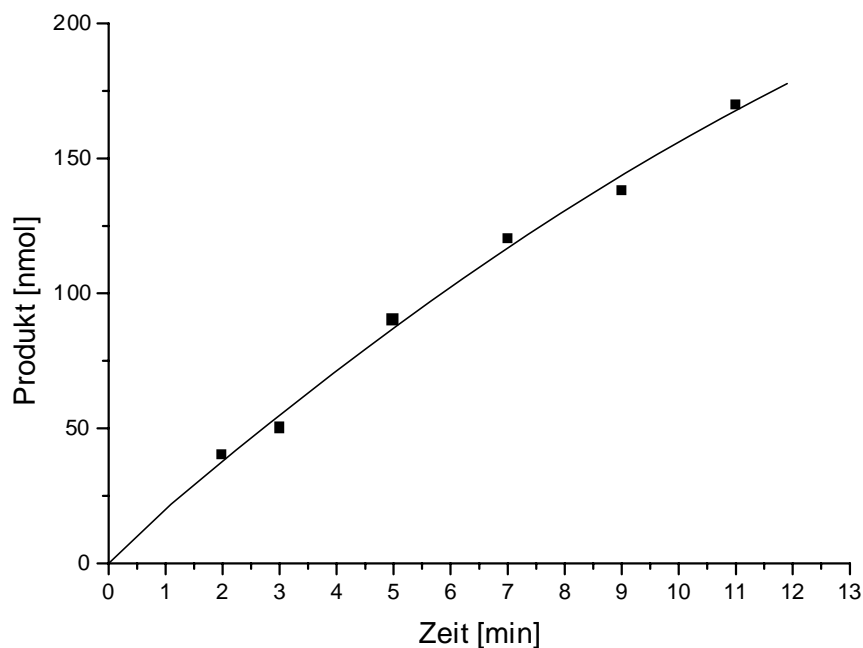


Abb. 5-18: Zeitlicher Verlauf der Produktbildung des Substrates S-(1,1,2,2-Tetrafluorethyl)-L-cystein.

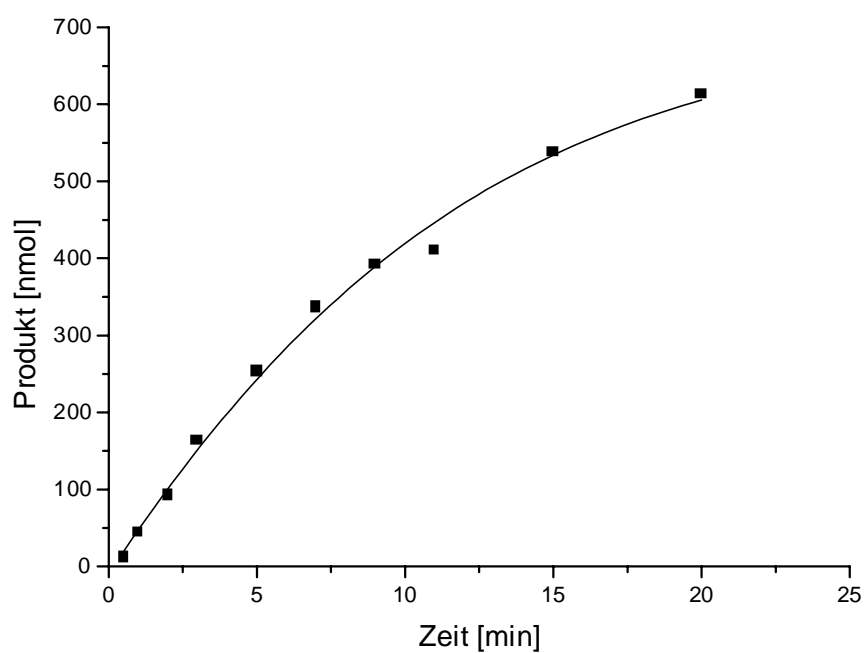


Abb. 5-19: Zeitlicher Verlauf der Produktbildung des Substrates S-(2-Chlor-1,1,2-trifluorethyl)-L-cystein.

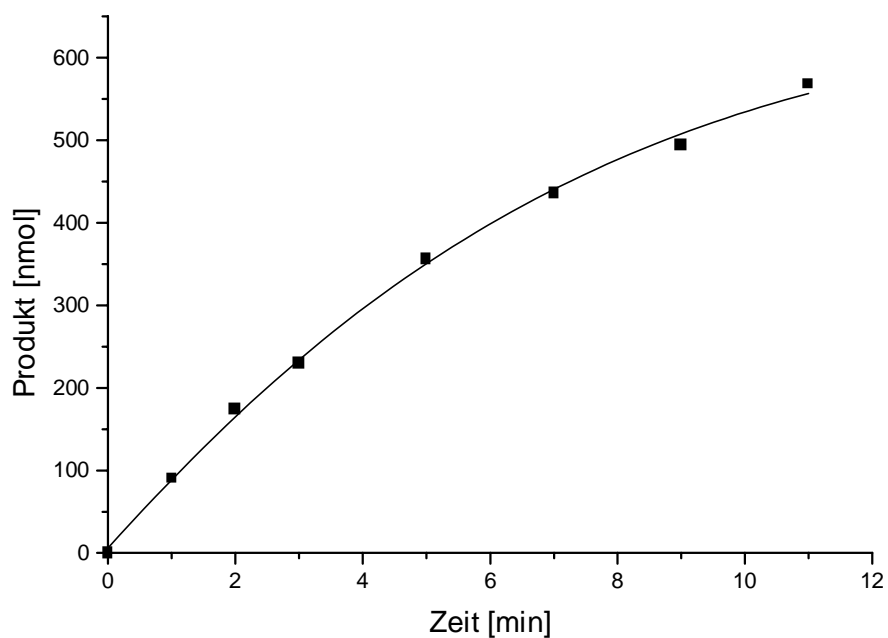


Abb. 5-20: Zeitlicher Verlauf der Produktbildung des Substrates S-(2-Brom-1,1,2-trifluorethyl)-L-cystein.

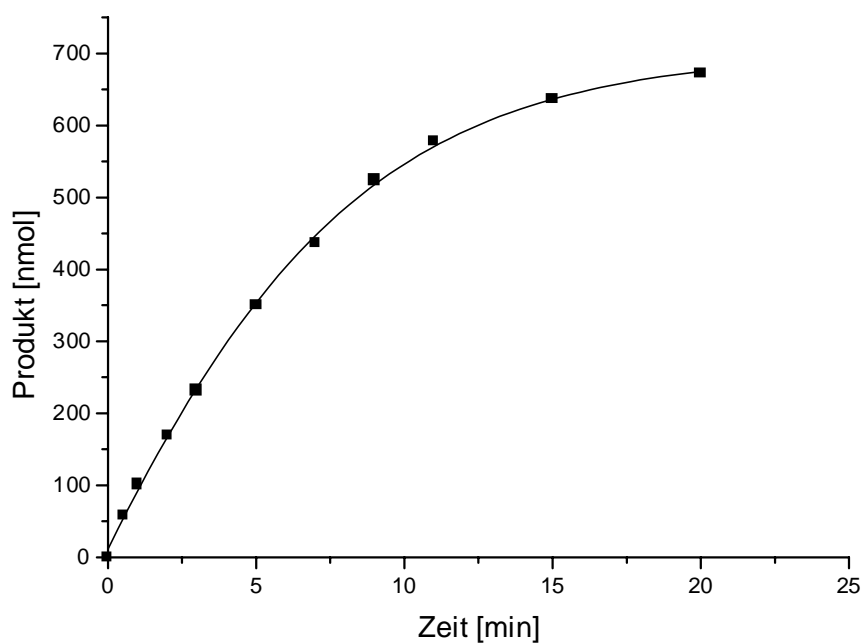


Abb. 5-21: Zeitlicher Verlauf der Produktbildung des Substrates S-(2,2-Dibrom-1,1-difluorethyl)-L-cystein.

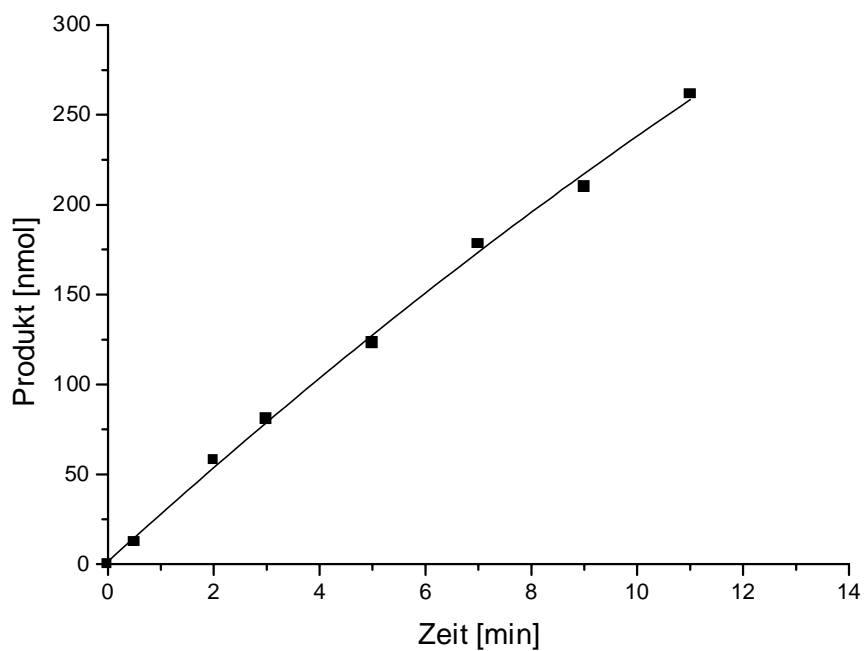


Abb. 5-22: Zeitlicher Verlauf der Produktbildung des Substrates S-[2-(Fluormethoxy)-1,1,3,3,3-pentafluorpropyl]-L-cystein.

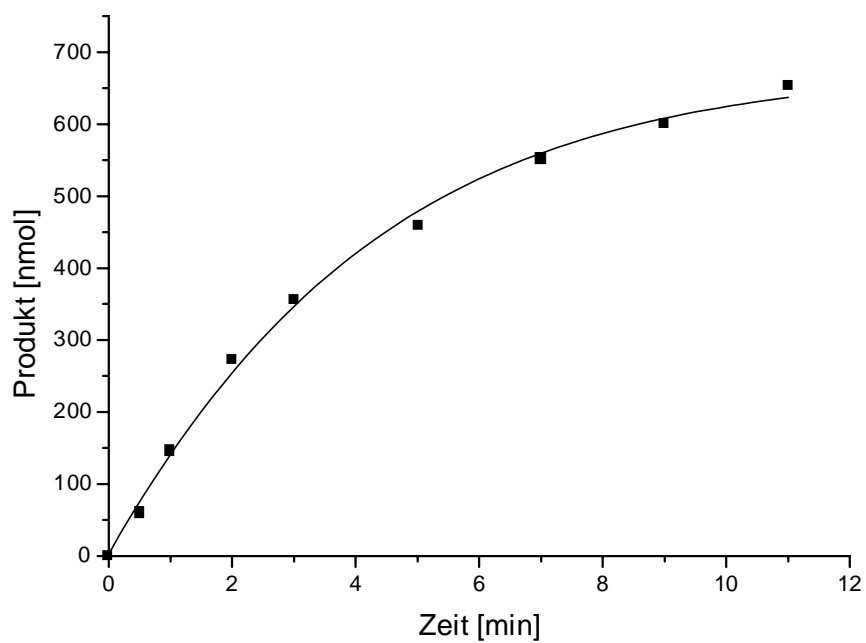


Abb. 5-23: Zeitlicher Verlauf der Produktbildung des Substrates S-(Pentachlorbutadienyl)-L-cystein.

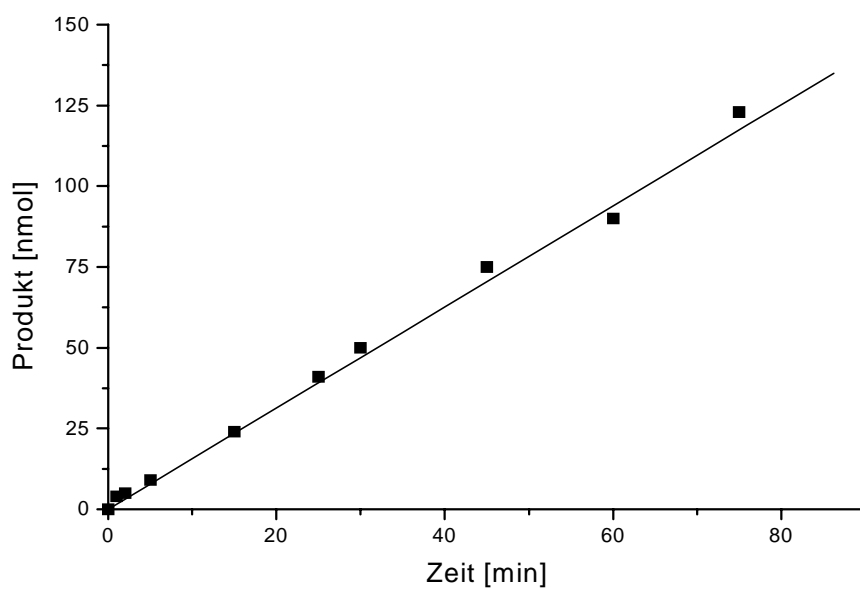


Abb. 5-24: Zeitlicher Verlauf der Produktbildung des Substrates S-(1,2-Dichlorvinyl)-L-cystein.

Aus den Abbildungen konnten für die einzelnen Substrate die Inkubationszeiten für die Bestimmung der  $K_m$ -Werte abgeleitet werden. Für die Bestimmung der  $K_m$ -Werte war es wichtig, im linearen Bereich der Verlaufskurve zu bleiben, da nur für diesen Bereich die Michaelis-Menten-Kinetik gültig ist.

Tab. 5-7: Abgeleitete Inkubationszeiten für die Bestimmung der  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Werte.

Substrat	Inkubationszeit [min]
S -(1,1,2,2-Tetrafluorethyl)-L-cystein	5
S -(2-Chlor-1,1,2-trifluorethyl)-L-cystein	15
S -(2-Brom-1,1,2-trifluorethyl)-L-cystein	2
S -(2,2-Dibrom-1,1-difluorethyl)-L-cystein	2
S -[2-(Fluormethoxy)-1,1,3,3,3-pentafluorpropyl]-L-cystein	4
S -(Pentachlorbutadienyl)-L-cystein	0,5
S -(1,2-Dichlorvinyl)-L-cystein	60
S -[2-(Fluormethoxy)-1,3,3,3-tetrafluor-1-propenyl]-L-cystein	Kein Umsatz

Zur Bestimmung der  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Werte wurden die Aktivitätstests entsprechend Abschnitt 4.2.1.1 durchgeführt. Die Auswertung erfolgte wiederum densitometrisch. Aus den Auftragungen 5-25 bis 5-31 ergeben sich die in Tabelle 5-8 aufgeführten  $K_m$ -,  $V_{max}$ - und  $V_{max} / K_m$ -Werte.

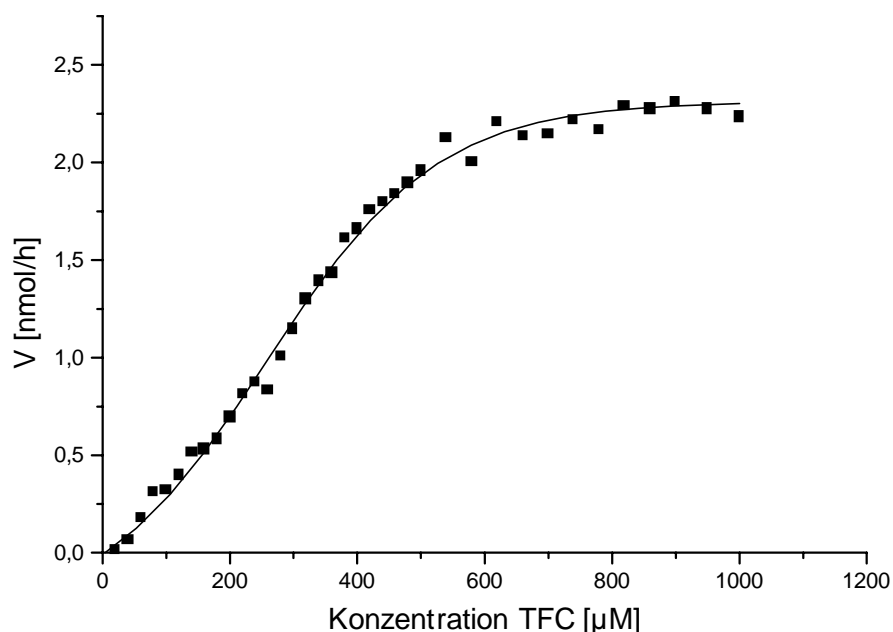


Abb. 5-25: Michaelis-Menten Diagramm für das Substrat S -(1,1,2,2-Tetrafluorethyl)-L-cystein.

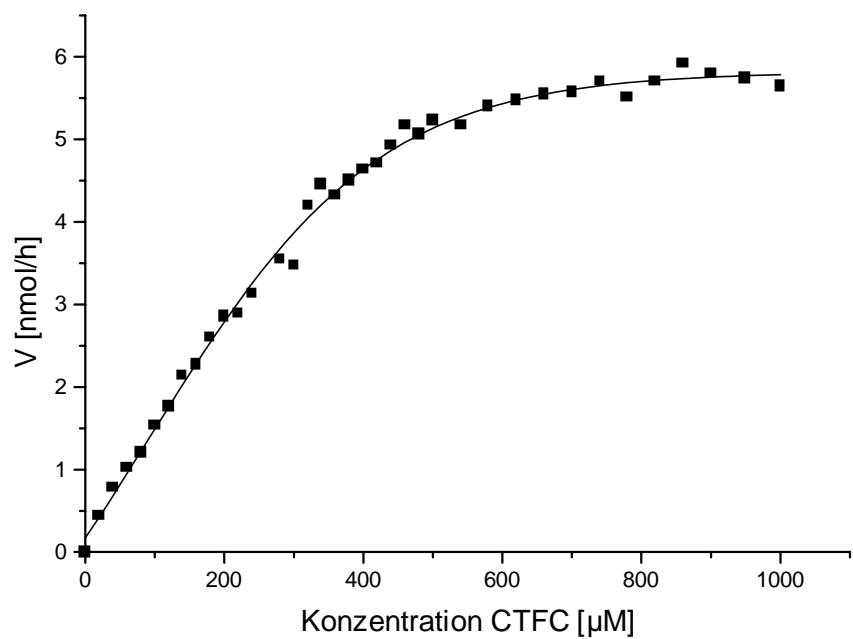


Abb. 5-26: Michaelis-Menten-Diagramm für das Substrat S-(2-Chlor-1,1,2-trifluorethyl)-L-cystein.

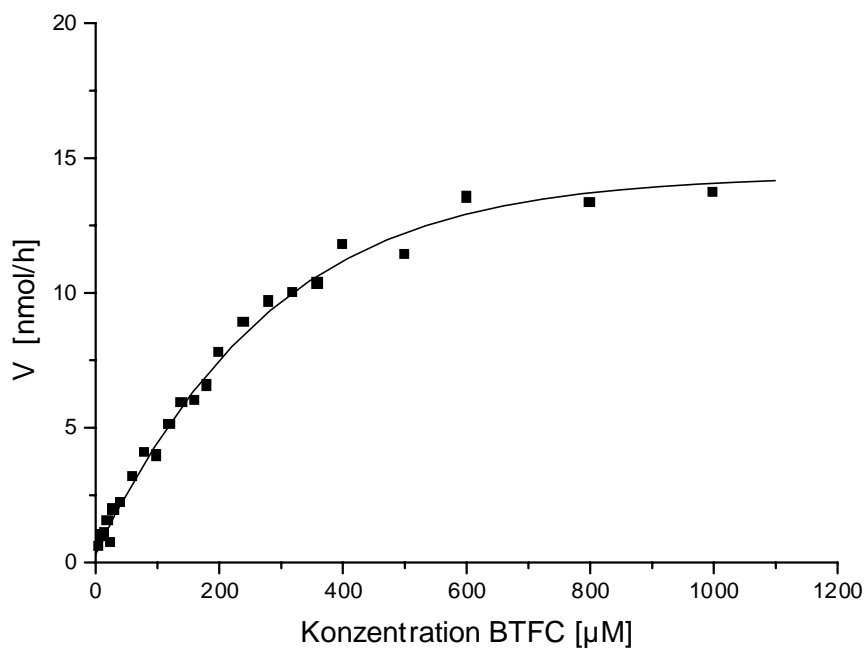


Abb. 5-27: Michaelis-Menten-Diagramm für das Substrat S-(2-Brom-1,1,2-trifluorethyl)-L-cystein.



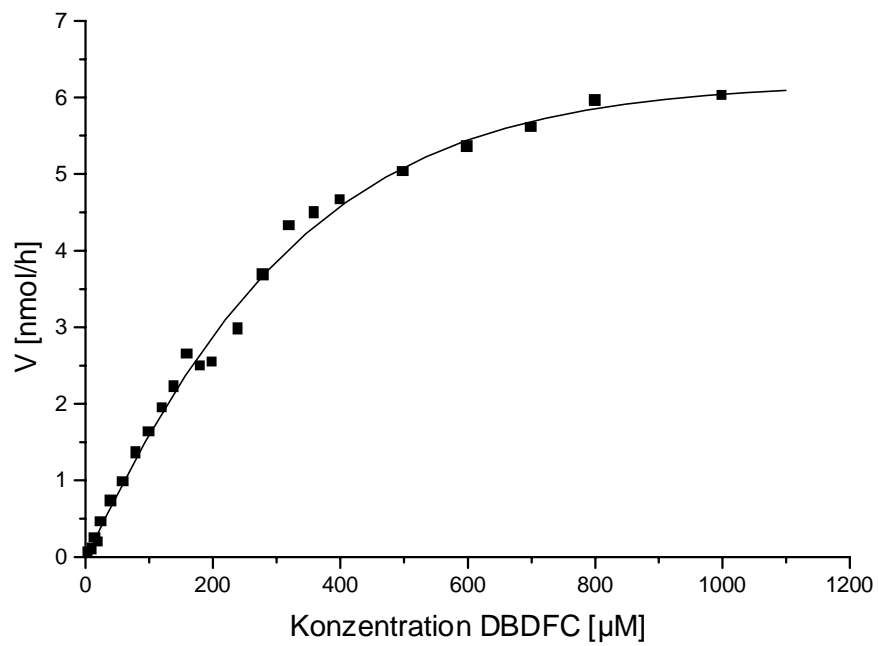


Abb. 5-28: Michaelis-Menten-Diagramm für das Substrat S-(2,2-Dibrom-1,1-difluorethyl)-L-cystein.

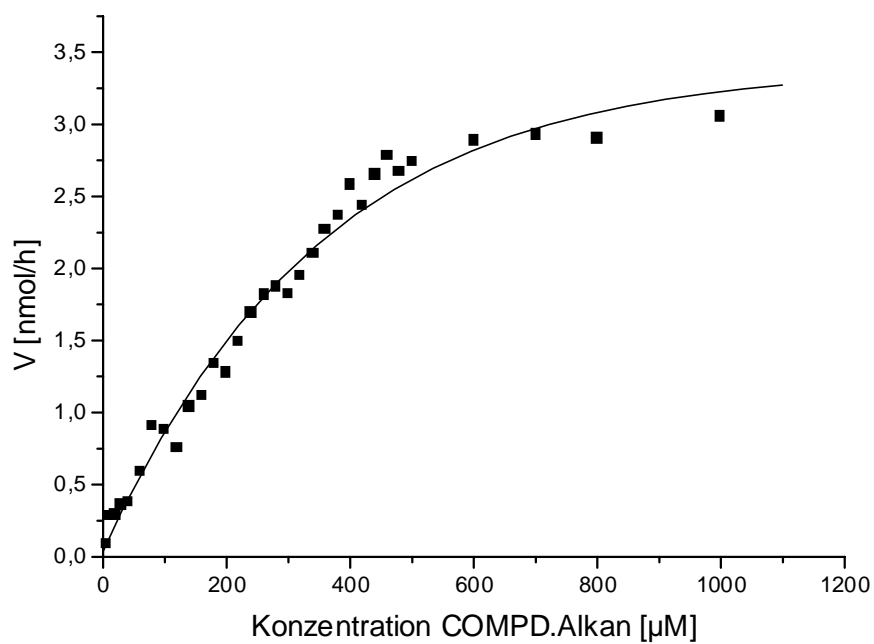


Abb. 5-29: Michaelis-Menten-Diagramm für das Substrat S-[2-(Fluormethoxy)-1,1,3,3,3-pentafluorpropyl]-L-cystein.

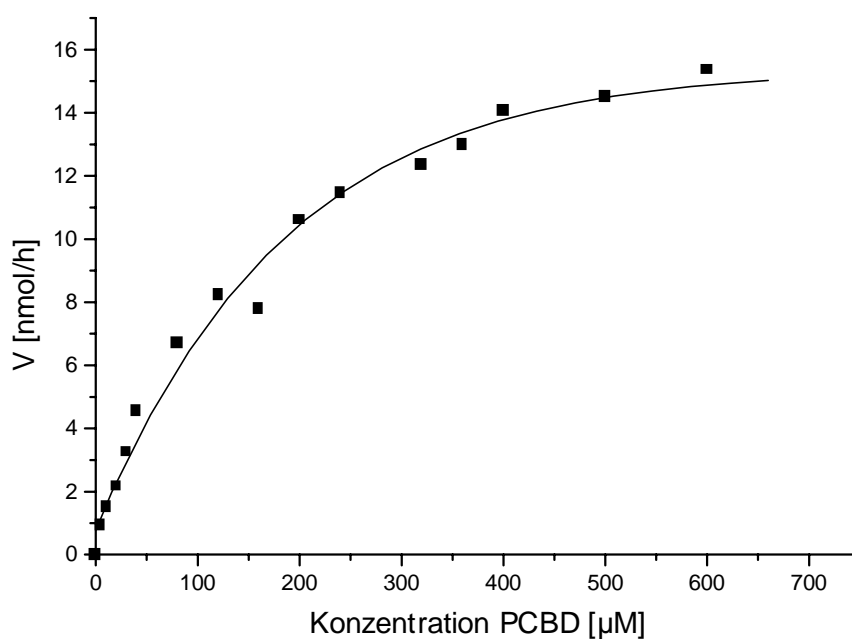


Abb. 5-30: Michaelis-Menten-Diagramm für das Substrat S-(Pentachlorbutadienyl)-L-cystein.

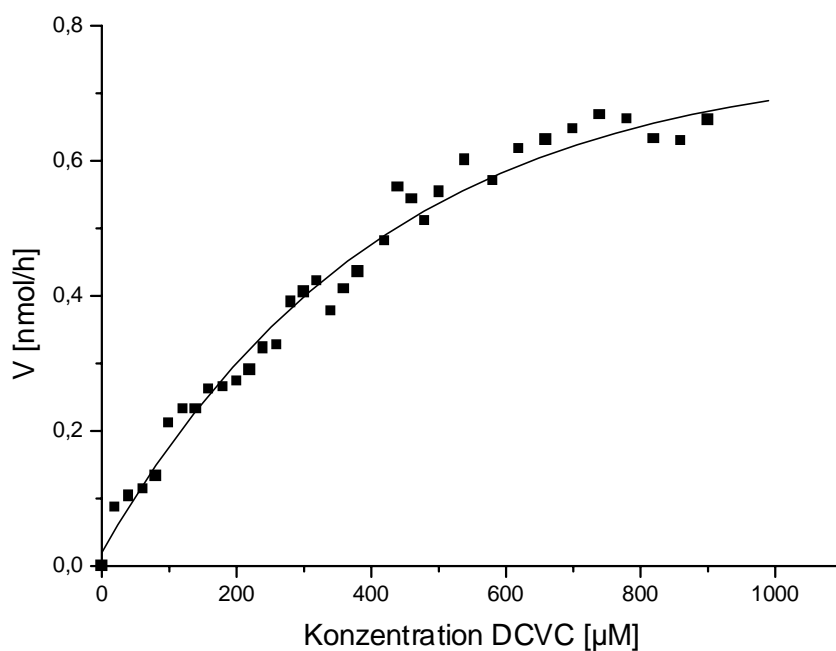


Abb. 5-31: Michaelis-Menten-Diagramm für das Substrat S-(1,2-Dichlorvinyl)-L-cystein.

Tab. 5-8:  $K_m$ - und  $V_{\max}$ -Werte für verschiedene Cystein-S-Konjugate.

Substrat	$K_m$ [ $\mu\text{M}$ ]	$V_{\max}$ [nmol/h]	$V_{\max}/K_m$ [ $10^{-3}$ l/h]
S-(1,1,2,2-Tetrafluorethyl)-L-cystein ( <b>1a</b> )	$302 \pm 3$	$2,3 \pm 0,03$	0,008
S-(2-Chlor-1,1,2-trifluorethyl)-L-cystein ( <b>1b</b> )	$211 \pm 3$	$5,78 \pm 0,05$	0,027
S-(2-Brom-1,1,2-trifluorethyl)-L-cystein ( <b>1c</b> )	$179 \pm 7$	$13,9 \pm 0,4$	0,078
S-(2,2-Dibrom-1,1-difluorethyl)-L-cystein ( <b>1d</b> )	$203 \pm 22$	$6,2 \pm 0,4$	0,03
S-[2-(Fluormethoxy)-1,1,3,3,3-pentafluor-propyl]-L-cystein ( <b>1e</b> )	$241 \pm 30$	$3,4 \pm 0,3$	0,014
S-(Pentachlorbutadienyl)-L-cystein ( <b>2a</b> )	$124 \pm 19$	$15,6 \pm 1,2$	0,126
S-(1,2-Dichlorvinyl)-L-cystein ( <b>2b</b> )	$273 \pm 47$	$0,75 \pm 0,07$	0,003
S-[2-(Fluormethoxy)-1,3,3,3-tetrafluor-1-propenyl]-L-cystein ( <b>2c</b> )	-	-	-

Die  $K_m$ -Werte der einzelnen Cystein-S-Konjugate differieren um den Faktor 2, die  $V_{\max}$ -Werte um den Faktor 20. Der Quotient  $V_{\max} / K_m$ , welcher ein Maß für die Rate der Acetylierung der Substrate ist, differiert um den Faktor 40.

Werden der  $\log P$  (n-Octanol / Wasser-Verteilungskoeffizient), als Maß für die Hydrophobizität, und die molare Refraktivität, als Maß für das molare Volumen der Verbindung (Berechnungen freundlicherweise von Herrn Dr. M. W. Anders, Rochester, NY durchgeführt), gegen den Logarithmus des Quotienten aus  $V_{\max}$  und  $K_m$  aufgetragen, so lassen sich Aussagen bezüglich der Substratbindung treffen.

Der Quotient  $V_{\max} / K_m$  für die Acetylierung der S-(2-Halogen-1,1,2-trifluorethyl)-L-cysteine steigt in der Reihenfolge Br (**1c**) > Cl (**1b**) > F (**1a**) an. In den Abb. 5-31 und 5-32 ist die gute Korrelation dieser Werte zu  $\log P$  bzw. zur molaren Refraktivität dargestellt.

Für die Substrate **1d**, **1e** und **2b** zeigt sich eine sehr gute Korrelation (s. Abb. 5-32 und 5-33).

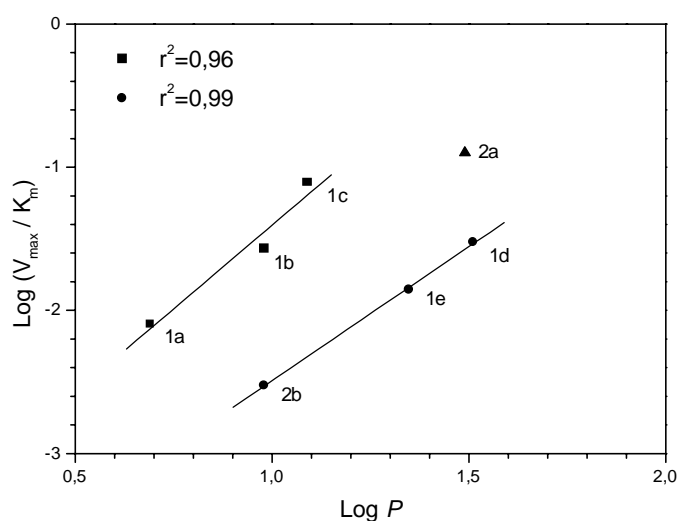


Abb. 5-32: Beziehung zwischen der Hydrophobizität und der Rate der Acetylierung für die Cystein-S-Konjugate **1a** - **1e** und **2a** - **2b**.

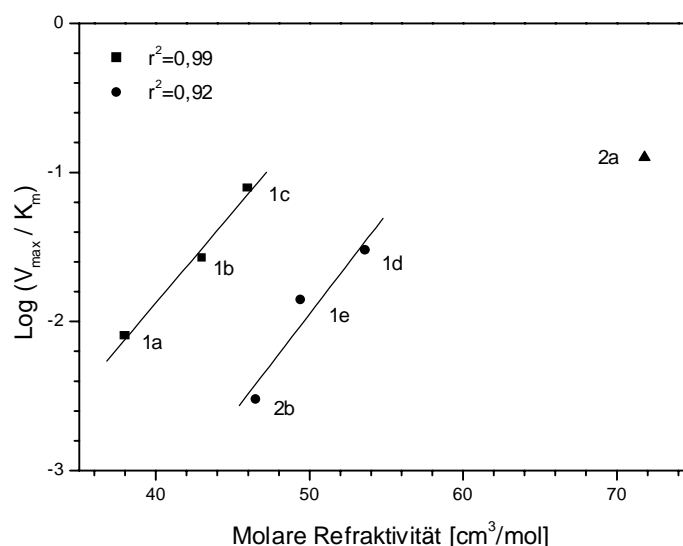


Abb. 5-33: Beziehung zwischen der molaren Refraktivität und der Rate der Acetylierung für die Cystein-S-Konjugate **1a - 1e** und **2a - 2b**.

## 5.6 Bestimmung der DNA-Sequenz der Phagenklone

Von Herrn Dr. A. Aigner waren zu Beginn der Arbeit *N*-Acetyl-S-Transferase positive Phagenklone zur Verfügung gestellt worden. Diese Phagenklone waren mit Hilfe eines gegen die NAcT gerichteten Antikörpers aus einer cDNA-Expressionsbank (Leber) isoliert worden und wurde zur weiteren Analyse zur Verfügung gestellt. Insgesamt wurden 6 Klone (A-H) gefunden, welche mit Anti-NAcT-IgG's positiv in Form einer Farbreaktion reagierten [Aigner, 1995].

### 5.6.1 Isolierung und Restriktion der Phagen-DNA

Die Phagenlysate aus Abschnitt 4.3.4.1 wurden entsprechend dem Abschnitt 4.3.4.2.2 aufgearbeitet und die DNA der Phagenklone isoliert. Die Ausbeuten an DNA geht aus der nachstehenden Tabelle hervor.

Tab. 5-9: Ausbeuten an DNA aus den verschiedenen *N*-Acetyl-S-Transferase-positiven Phagenklonen A-H.

Phagenklon	A	B	C	E	G	H
Ausbeute [ $\mu\text{g}$ DNA]	920	280	830	80	110	410

Da die cDNA-Insertionen über die Erkennungssequenz des Restriktionsenzym *Eco* RI in die Phagen-DNA inseriert waren, wurde die DNA mit diesem Enzym hydrolysiert (s. 4.3.8.1).

Lediglich bei den Phagenklonen A und C konnten die cDNA-Insertionen mit Hilfe des Enzyms *Eco* RI isoliert werden (s. Abb. 5-34). Die Analyse in einem 0,7 %igen Agarosegel zeigte, daß die Insertion des Phagenklons A 1,4 kb und die Insertion des Phagenklons C 1,3 kb groß war. Im Falle der Phagenklone B, E, G und H konnte mit

Hilfe der Restriktionsendonuclease *Eco* RI keine cDNA-Insertion aus der Phagen-DNA hydrolysiert werden.

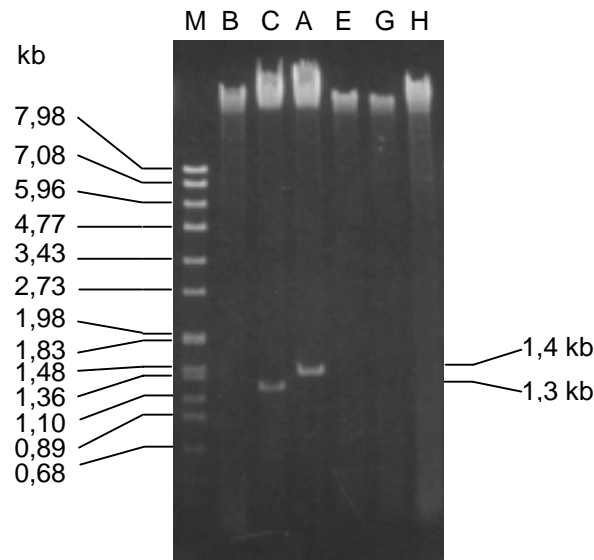


Abb. 5-33: 0,7 %iges Agarosegel mit den Restriktionsansätzen (*Eco* RI) der Phagenklone A, B, C, E, G und H.

Die cDNA-Insertionen aus den Phagenklonen A und C wurden gemäß 4.3.7 und 4.3.4.3.3 in einem Agarosegel getrennt und aus dem Gel isoliert.

Eine Vorrestriktion mit den Enzymen *Kpn* I und *Sal* I bei den Phagenklonen B, E, G und H mit anschließender Restriktion mit dem Enzym *Eco* RI führte nicht zu den für eine Klonierung notwendigen Mengen an cDNA aus den Insertionen.

### 5.6.2 PCR zur Amplifizierung der cDNA-Insertionen aus den Phagenklonen

Um die nicht zu restringierenden cDNA-Insertionen aus den Phagenklonen zu analysieren, wurden die Insertionen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Die Primer wurden so gewählt, daß die *Eco* RI-Schnittstellen, über die die cDNA-Insertionen in die Phagen-DNA inseriert waren, mit amplifiziert wurden. Entsprechend dem Abschnitt 4.3.6 wurden die Ansätze pipettiert und nach der Amplifikation wurden sie in einem 1,2 %igen Agarosegel analysiert. Da weitere Nebenprodukte auftraten, wurden die Amplikons aus dem Gel eluiert (s. 4.3.4.3.3), gereinigt und mit *Eco* RI restringiert (s. 4.3.8.1).

Abb. 5-35 zeigt die PCR-Ansätze der Phagenklone A, B, C, G, E und H.

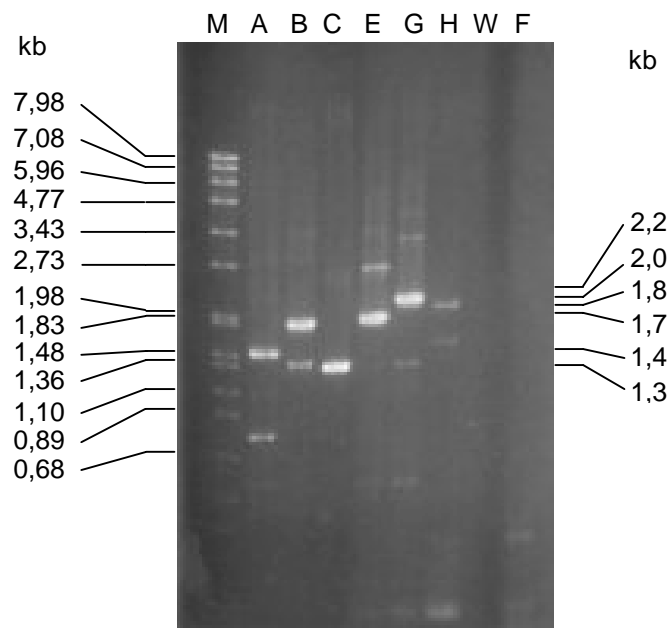


Abb. 5-35: 1,2 %iges Agarosegel mit den PCR-Ansätzen der Phagenklone A, B, C, E, G und H.

Zur Kontrolle wurden die Insertionen aus den Phagenklonen A und C, von denen die Größe der cDNA-Insertionen durch Restriktionsanalyse bekannt waren, ebenfalls amplifiziert. Für den Ansatz des Phagenklons C waren die Bedingungen der PCR optimal, da nur die cDNA-Insertion amplifiziert wurde. Bei den anderen Ansätzen wurden, neben den cDNA-Insertionen, auch Nebenprodukte amplifiziert, jedoch unterschieden sie sich deutlich in der Größe der amplifizierten Produkte. Die Wasserprobe bzw. die Fremd-DNA-Probe zeigten keine Produkte, was auf kontaminationsfreie Lösungen und kontaminationsfreies Arbeiten hinwies.

Aus der Gelanalyse ließen sich folgende Größen für die cDNA-Insertionen ableiten:

Phagenklon	A	B	C	E	G	H
Größe [kb]	1,4	1,7	1,3	1,8	2,2	2

### 5.6.3 Sequenzierung der cDNA-Insertionen aus den Phagenklonen

Die mit *Eco* RI restringierten cDNA-Insertionen wurden in den Vektor pBluescript SK(-) umklontiert (s. 4.3.8.3) und anschließend entsprechend Abschnitt 4.3.8.4 sequenziert. Ausnahme hierbei war die cDNA-Insertion aus Phagenklon B. Diese ließ sich weder aus der Phagen-DNA restringieren noch ließ sich die mit Hilfe der PCR amplifizierte und gereinigte cDNA-Insertion in den Vektor klonieren.

Ausgehend von M13- und M13(-21) reverse-Primern wurden aus den erhaltenen Sequenzen weitere Primer für das Sequenzieren abgeleitet, die sowohl den sense- als auch den antisense-Strang abdeckten. So konnten für die Phagenklone A, E, G und H die vollständigen Sequenzen aus der 3'- und 5'-Richtung abgeleitet werden.

Für den Phagenklon A ergab sich nachstehende Sequenz (Abb. 5-36).

```

1   AATTCCGGTT CATTAGGTGT GTCAAAGCTT GGCACACCAC CAAAGGCATC CCCGATTTGC
61  GCAGCCGAAA GCGTTGCCAC ATCCCCACTA AAGAGGGCAG CTGATAACTT TTCTGCATCT
121 TCAACGGCTG CTTGACCATG GACAAACTTC GTCACTTCTT GTGCCAAACG ACGTTGTGCC
181 AAACGCTCAC CTGGGTTAGT TTCAACGGCC TTCGCCAACG TCTCAATTTT ATCTACACTT
241 AGGAAAGTGA AATACTTCAA GTACTTCACC ACATCAGCAT CACTTTGATT CAACCAGAAT
301 TGGTAGAAAG TATAAGGTGA GGTCTTCTTT GGATCCAACC AGATGCGTTC CCTTCAGATT
361 TACCAAACCTT CTTGCCCCGT GAATCTGTCA TCAAAGGAAT GGTGAGCCCA AACGCTTTAG
421 CGTCATTTCC CTCTAACCAA TGAATCAAAT CAATTCCCGA CGTTGATGTT ACCCCATTGG
481 TTCCGACCCA CCAATTTGTA ACTTAACGTC TTCACGACGC CACAATTCAT GGAAATCAAT
541 CCCTTGTAGC ACTTGGTAAG TAAATTCAGT AAATGAAATT CCTGTTTCCA AACGTGACGC
601 CACGACATCC TTTTTCACAA TCACGTTAAT TGAGAATAAC TTCCCATAAT CACGCAAAAA
661 GTCTGTCAAT GTCAACTTTC CTAGCCAATC ATTGTTATTC ACAATACGGG TGTATCATATC
721 ACCAAAGAGT TTTGTTACTT GCGCTGTGAT GCCCTTTTCG TTTTCAGCCA ATTGTTTAGG
781 CGTCAAAAGT TGACGTTCTG TTGTAGGCCG TGGGTGCGCA ATGGCCCCAG TTGCCCCACC
841 AACAAATATC ACAGCCTTAC CACCACCGTT TTGGAAACGC TTTAACACCA TAAATGGAAT
901 GAGGTGTCCA AGATGCAAAG AATCAGCAGT TGGGTCTGTC CCAACGTAAG CACCAATCTT
961 GCCCTCGGCC ATTGCTTCTA GTAACCCTGC TTCATCTGTG ACCTGGTTTA ACCTCCGCCA
1021 CGCCAGTTTT AAATCTTCAA TAAATTCAT CTGTCTCTCC TTTGTTGTCG TTAAATAGC
1081 AAAAACCCTC CTATACCAAC TATAGGACGG TTTTAACCGT GGTACCACCT AAATTGTAAG
1141 TCATCGGACC TACCACTTAT TACGCCTTAT CGCGGCAGAC GTCATACTAC TTAATGTTGT
1201 GTAACGCGAC CACAGGGGCG GGCTAGTTCA CAGCACCCAC TAACCTTCTT TGACGGCCAA
1261 TCTGTGTCTT TATCAACTGA TGATGTTTTT ATTATATCAG ATAATCTGAT CAATATGTGA
1321 TTTTATATCAG AATTACGGCA TGAATGCCGT CCATGACAGC AACACTCACA TCATTTCCAG
1381 TTATCCCCAT TTTCTCTGGT AGAATGGCCT TATATCGCCT AAATTACTTT TGGAGGTTGC
1441 GATGTCAAAC CGTTCGGGAA TT

```

Abb. 5-36: cDNA-Sequenz des Phagenklons A.

Die Gesamtzahl der Basenpaare der cDNA-Insertion aus dem Phagenklon A beträgt 1462 bp.

Diese Sequenz wurde auf einen vollständigen bzw. einen teilweise vorhandenen offenen Leserahmen hin untersucht. Weiterhin wurde für die gefundenen offenen Leserahmen die Codierungswahrscheinlichkeit errechnet. Die Berechnungen wurden mit Hilfe eines Computers durchgeführt (Programm 'DNA Strider', Apple Macintosh).

Für die Sequenz der cDNA-Insertion aus dem Phagenklon A konnte ein offener Leserahmen mit hoher Codierungswahrscheinlichkeit gefunden werden. Dieser offene Leserahmen ist unvollständig und beginnt bei Base 436 des Gegenstranges zu der o. a. Sequenz. Der offene Leserahmen umfaßt 1025 bp. Damit ist diese Sequenz nur um 125 bp größer als die für die *N*-Acetyl-S-Transferase zu erwartende Größe von ca. 900 bp.

Aus den Basentripletts läßt sich die nachstehende Teilsequenz des codierten Proteins ableiten.

```

M A W R T L N Q V T D E A G L L E A M A E G K I G A Y V G T D P T A D S L H I L
G H L I P F M V L K R F Q N A G G K A V I I V G G A T G A I G D P R P T T E R
Q L L T P W Q L A E N E K G I T A Q V T K L F G D D D T R I V N N N D W L G K
L T L T D F L R D Y G K L F S I N V M L K K D V V A S R L E T G I D F T E F T
Y Q V L Q G I D F H E L W R R E D V K L Q I G G S D Q W G N I T S G I D L I H
S L E G N D A K A F G L T I P L M T D S T G K K F G K S E G N A I W L D P K K
T S P Y T F Y Q F W L N Q S D A D V V K Y L K Y F T F L S V D E I E T L A K A
V E T N P G E R L A Q R R L A Q E V T K F V H G Q A A V E D A E K L S A A L F
S G D V A T L S A A Q I G D A F G G V P S F D T P N E P E

```

Abb. 5-37: Aus dem offenen Leserahmen der cDNA-Sequenz des Phagenklons A abgeleitete Aminosäuresequenz.

Für diese abgeleitete Proteinsequenz ergab die Datenbankabfrage eine hohe Übereinstimmung (58 % bei 134 bp) mit dem Enzym Tyrosyl-tRNA-Synthetase (EC 6.1.1.1) aus *Bacillus stearothermophilus* und *Bacillus caldotenax*. Weiterhin sind Übereinstimmungen zu diesem Enzym aus den Organismen *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* und *Saccharomyces* zu finden.

Dieses Enzym bindet Tyrosin kovalent an die entsprechende tRNA und überträgt dann selektiv, vorgegeben von der mRNA, die Aminosäure Tyrosin bei der Translation. Bei diesem Vorgang wird ATP verbraucht.

Ein typisches Sequenzmotiv für die Klasse der Tyrosyl-tRNA-Synthetasen ist die ATP-Bindestelle HIGH, bzw. HIGN, welche sich in der Variation HLGH auch in der oben dargestellten Sequenz wiederfindet (grau unterlegt). Weiterhin zeigt sich ein zweites typisches Motiv dieser Klasse: das KFGKS-Motiv.

Das Vorkommen dieser für Klasse-I tRNA-Synthetasen typischen Sequenzmotive und die hohe Homologie zu Tyrosyl-tRNA-Synthetasen weist darauf hin, daß es sich bei der cDNA-Insertion des Phagenklons A um die Teilsequenz einer Tyrosyl-tRNA-Synthetase aus Schwein handelt.

Für die cDNA-Insertionen aus den Phagenklonen E, G und H ergab sich, daß es sich bei diesen Klonen um Fragmente unterschiedlicher Größe der gleichen Sequenz handelte. Es konnte die in Abbildung 5-38 dargestellte cDNA-Sequenz ermittelt werden.



```

1      CCGGGGACAA GTCTTAGATG GTATCGAACA AGGGGAGTAT ACGGAGCCTT TCACAACCTGA
61     AACACTCAAG TCAGTCCGTA AGGCGATCCG CACTGCGCAA CAAGACTTAA AAATTTACAA
121    ATGGGCAGCC GACCATGATT ACAATGGTAA CGATATTCTA GCAGCTTACG AGTTATACCG
181    CCCGGCATTG GATTAGTGGA TAACACGGCG CTGAATCAAT ATTTACAAGA CTTAGAGAGT
241    CGCTTGACAA TTGGCTTCTT TGAGCTAGCT GACTTTGAAG AGTCGCTACT GAACTACTTG
301    CTAAAATCAC CAAAAAATAA ATTATTTCATC ATAGAAAAGG GATAAACATG GCATTAACAG
361    CAGATAAACA AGCATTAATT TGGAAAACAT TGAACGAGAC CCGCGGGAAG ATTGAACCTT
421    CTGAATATAG AACTATATTT TCGGGTTGAT GTTTTATAAG TTTCTATCTG AAAAGGCGCA
481    AACATGGCTG GATCAGCAAT TGCGTGGCGA AACTTGGGCC TCAGTCTGGG AACAGAATCC
541    TGAAGAGGCC GCGGCCTTTA TGCAAACCAA GTTAGGGTAT GTGATTCAAC CAGGCGAACT
601    CTTTAGTGAC TGGCAAGCAG CCATAACGTG GATCAATTCA ACATTACCAA CGTGGCAGAT
661    GCGTTAGTGC ACTTTAACCA AGGCATTCAA CAAGGTGCCA AGGCTACTTT TGAAAGGCATC
721    TTTGACGACA TGGATTTGGC TTCAAGCCGT CTTGGTAGCA ATACGCAAAC GCGGACGAAG
781    ACCTTGATGG ATTGGATTAG TTTGATTGAC CAAATCGAGT TGGATGAAGA CGCGGATGTG
841    TTGGGTGATC TATACGAATA CTTGATTGGG ATGTTTGCGG CTAATTCTGG CGCTAAGGCT
901    GGTGAGTTCT ATACGCCACA CCAAGTGTCA GATATTATGG CGCGGATCCT AACGGCTGGT
961    CGTGAAGATA TGCCAACGTA CAGCCTCTAT GACCCAGCCA TGGGATCAGG CTCATTGCTT
1021   TTGACGACTG CTTTCATACAT GAAGAATGAT GGTGTTTCGTG GGGCCATTAA GTACTACGGC
1081   CAAGAAGTTA TCACGACAAC CTATAACTTG GGCCGAATTA ACTTGATGAT GCACGGGGTG
1141   GAGTATAACG ATATCAATAT CCATAATGCA GATACCTTGA GTTCAGACTG GCCTGATGGG
1201   GTCCAAAGTG GGGTTGATAG CCCGCGTATG TTTGATGCCG TGATGGCGAA CCCCCCTTAC
1261   TCACTTAAGT GGGATAACGA TAATCGAGAA GATGACCCGC GATTTAAGTC AGGGATTGCG
1321   CCTAAGTCAA AGGCTGACTT TGCGTTCCTA CAGCATGGTT TGTATCACTT GAAGCAAGAT
1381   GGCCGGATGG CGATTGTTTT GCCACACGGG GTGTTGTTCC GTGGTGCGGC AGAGGGTCGT
1441   ATTCGCCAAG CATTACTCGA AAATCGCAAT ATTTGCGCGG TCATTGGGTT GCCCGAAAAG
1501   ATCTTTACGA ATACGGGGAT TCCAACCATT ATTATGATTG TGGAAAAGAA CCGGACGACT
1561   GATGATGTGC TCTTTATTGA TGCTTTCAA GGGCTTTGAA AAGCAGAAGA ACAATAACAA
1621   GTTGCGCCAA GAAGACGTGG ACTTAATTGT GGAGACGTTT TTAATCGGA AAGACGTGGA
1681   CAAGTATGCG CACGTTGCGA GCTTTGAAGA GATAAGGAAA ACGACTTTAA CCTCAACATC
1741   CCACGTTATG TGGACACCTT CGAAGAAGAA GATCCAGTTG ATTTGGTGGC TGTTAGCCAG
1801   GATCTCGTTG ATGTTAATCA TGACATTGCG CAAAGTGAAG CTGACTTATT AGCGATGATT
1861   AGTGATTTAG CAGTCACAGA AGATAGCCAG GAGTTATCGC ATCAGCTAAG CAATTATTTG
1921   GAGGCAAGCA TGAGTAATAA AGTGCCGCAA ATTCGATTTA ATGGTTATAG TGATGCTTGG
1981   GTACAGCGTA ACCTTGCCGA GTTGGCAACG ATGAACGCTA GAATTGGCTG GCAAACCTGC
2041   GAACATCAG

```

Abb. 5-38: cDNA-Sequenz der Phagenklone E, G und H.

Die cDNA-Insertion aus den Klonen E, G und H ergeben eine Gesamtsequenz von 2049 bp.

Die Analyse der Sequenz ergibt eine hohe Codierungswahrscheinlichkeit für den Leserahmen 2, beginnend an Position 350. Der Leserahmen ist offen und umfaßt 1699 Basen. Aus der Basenabfolge des Leserahmens läßt sich die in Abbildung 5-39 abgeleitete Aminosäuresequenz ableiten.

```

M A L T A D K Q A L I W K T L N E T R G K I E P S E Y K N Y I F G L M F Y K F
L S E K A Q T W L D Q Q L R G E T W A S V Q E Q N P E K A A A F M Q T K L G Y
V I Q P G E L F S D W Q A A I N V D Q F N I T N V A D A L V H F N Q G I Q Q G
A K A M F E G I F D D M D L A S S R L G N T Q T R T K T L M D W I S L I D Q I
E L D E D A D V L G D L Y E Y L I G M F A A N G G A K A G E F Y T P H Q V S D
I M A R I L T A G R E D M P T Y S L Y D P A M G S G S L L L T T A S Y M K N D
G V R G A K K Y Y G Q E V I T T T Y N L G R I N L M M H G V E Y N D I N I H N
A D T L S S D W P D G V Q S G V D S P R M F D A V M K N P P Y S L K W D N D N
R E D D P R F K S G I A P K S K A D F A F L Q H G L Y H L K Q D G R M A I V L
P H G V L F R G A A E G R I R Q A L L E N R N I S A V I G L P E K I F T N T G
I P T I I M I L E K N R T T D D V L F I D A S K G F E K Q K N N N K L R Q E D
V D L I V E T F L N R K D V D K Y A H V A S F E E I K E N D F N L N I P R Y V
D T F E E E D P V D L V A V S Q D L V D V N H D I A Q S E A D L L A M I S D L
A V T E D S Q E L S H Q L S N Y L E A S M S N K V P Q I R F N G Y S D A W V Q
R N L A E L A T M N A R I G W Q T C E H Q

```

Abb. 5-39: Aus dem offenen Leserahmen der cDNA-Sequenz der Phagenklone E, G und H abgeleitete Aminosäuresequenz.

Diese Proteinsequenz zeigt eine hohe Homologie zu der Untereinheit M des Typ I seitenspezifischen Restriktionsenzym *Eco* R124/3 I (EC 2.1.1.72). Weitere Homologien lassen sich auch für ähnliche Proteine aus *Helicobacter pylori*, *Mycoplasma pneumoniae* und noch weiteren Organismen finden.

Für die cDNA-Insertion aus Phagenklon C konnten ebenfalls ausgehend von den Primern M13 und M13 (-21) reverse die in den Abbildungen 5-40 und 5-41 dargestellten Teilsequenzen ermittelt werden.

```

1      AATTCCGGGT AACCAAGAAC AATTGGCTGA TCCCGAGAAA TTAAAGTATT GGATGAATGT
61     TGA CTTGTAC GTTGGCGGGG CCGAACATGC TGTGTTACAC TTATTGTACG CCGCGTTTCT
121    GGCACAAGTT CTTGTATGAT CTTGGCGTTG TGCCAACAAA GGAACCCCTC CAAAAGCTGG
181    TCAACCAAGG TATGATTCTT GGTGAGAACC ATGAAAGATG TCGAAGTCAA AGGGTAACGT
241    GGTCAATCCG GATGATATCG TGGCTGAATT TGGTGCCGAT ACCCTAAGAG TGTATGAAAT
301    GTTCATGGGA CCATTGACAC AAAGCAAGCC ATGGTCTGAA GAAGGCATTA CGGGCTCACG
361    CCGTTGGTTA GATCGTGTTT GCGCCTTGTT GATT

```

Abb. 5-40: cDNA-Sequenz des Phagenklons C, ausgehend von den Primern M13 und TK-C201 (394 bp).

```

1      AATTCCTTTG ATGTCGCTTG CGAACGGATC GGCAGCTTGC GAAGACTGCA ACTGGGGCTT
61     CTTTTTCCGA ACCGAATGTT TTGACGCGCT TGGTCATTCT GTGCTTGCAT TGCCGCTAAT
121    TGTT CAGCAG CGCGTTGTGT TTGTCCCTGA GGCTGCGGGC GTTTTGATTG TGGTTGACGA
181    GCAGCTGGAC TATTATCAGG TTGTTTTTTT GCTTGGATGC GTTGACGGGC GCGGGCTAGA
241    ATTT CATCTG CACTTAATAT CTGGCCGTCC ACATTGATTT TATCAACATG CTTTCCTTGC
301    ATTTT TGAAT CGCTTGGATG CTGTT

```

Abb. 5-41: cDNA-Sequenz des Phagenklons C, ausgehend von den Primern M13(-21) reverse und TK-C201r (325 bp).

Insgesamt wurden ca. 50 % (719 bp) der cDNA-Insertion aus Phagenklon C sequenziert. Auf eine vollständige Sequenzierung wurde verzichtet, da die Datenbankabfrage eine hohe Übereinstimmung (81 %) mit einer Leucyl-tRNA Synthetase aus *Bacillus subtilis* ergab.

Ein Vergleich der DNA und auch der abgeleiteten Proteinsequenzen der Phagenklone untereinander ergab keine signifikanten Übereinstimmungen. Jedoch benötigen alle drei Enzyme, welche durch die Sequenzen codiert werden, ATP als Cofaktor. Dies deutet daraufhin, daß die verwendeten Antikörper die ATP-Bindetasche erkennen.

## 6. Diskussion

Bei der Entgiftung von lipophilen Xenobiotika katalysiert die Cystein-S-Konjugat-spezifische *N*-Acetyl-S-Transferase (NAcT) einen wichtigen Schritt, der letztlich zur Ausscheidung der Verbindungen über die Nieren führt. Aufgrund der Substratspezifität und des Vorkommens der NAcT unterscheidet sich dieses Enzym von anderen *N*-Acetyltransferasen und stellt somit ein repräsentatives Enzym des Mercaptursäureweges der Entgiftung dar.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Reinigungsstrategie verbessert und die kinetischen Daten des Enzyms vervollständigt werden. Weiterhin sollten die DNA-Sequenzen von Anti-NAcT-Antikörper-positiven Phagenklonen, welche aus Vorarbeiten zur Verfügung standen [Aigner, 1995], aufgeklärt werden. Aus diesen Sequenzen sollte dann die Aminosäuresequenz der NAcT abgeleitet werden.

Als Ausgangsmaterial für die Präparation des Proteins wurden, aufgrund der hohen spezifischen Aktivität der NAcT in Leber und Nieren, Schweinenieren verwendet. Diese konnten in ausreichender Menge schlachtfresh aus einem Schlachthof bezogen werden.

Von den Nieren wurde ausschließlich Cortex-Gewebe verwendet, da hier die proximalen Tubuli lokalisiert sind. Diese zeichnen sich durch eine besonders hohe Aktivität der NAcT aus. So konnten aus 652 g Nieren-Cortex 22,6 g (Feuchtwicht) Mikrosomen erhalten werden. Mikrosomen, die als Artefakte der Gewebeaufschlußmethode aus endoplasmatischen Reticulum-Membranen entstehen, wurden im Gegensatz zu früheren Präparationen [Jäger, 1993; Pasternack, 1994; Aigner, 1995] mit 150 mM Tris-HCl, pH 8,0 gewaschen. Durch diesen Schritt werden basische, cytosolische Proteine abgetrennt [Lambert, 1991].

Bezogen auf das Gesamthomogenisat der Ausgangsaktivität des Nierengewebes wurden in den Mikrosomen nur ca. 5 % der Aktivität gefunden. Der Verlust von 95 % der Aktivität erklärt sich aus der Präparationsmethode. Um Mikrosomen zu erhalten, welche hauptsächlich aus Membranen bestehen, die in dem endoplasmatischen Reticulum zuzuordnen sind, ist eine schonende Methode des Aufschließens notwendig. D. h. der mechanische Streß, welcher durch den Ultra-Turrax auf das Gewebe ausgeübt wird, sollte möglichst gering sein. Dadurch wird nur ein geringer Teil des Gewebes aufgeschlossen und es verbleiben große Gewebeteile, in denen die Zellen intakt sind.

Wird größerer mechanischer Streß auf das Gewebe und damit auf die Zellen ausgeübt, finden sich in den Mikrosomen auch Proteine aus anderen Membranen, wie z. B. aus der Cytoplasmamembran oder aus der Kernmembran [Lambert, 1991].

Mit Hilfe des Detergens DesoxyBIGCHAP, welches in einer Konzentration von  $2,5 \times \text{cmc}$  (5 mg/ml) eingesetzt wurde, konnte die NAcT-Aktivität aus den so gewonnenen Mikrosomen gelöst werden. Dieses Detergens wurde nach mehrstufiger Synthese erhalten und war nicht immer von gleichbleibender Qualität. Diese Verunreinigung zeigte sich auch in käuflichen Produkten. Weiterhin ist das Detergens DesoxyBIGCHAP cancerogen.

Aus Vorarbeiten war bekannt, daß handelsübliche Detergenzien zu einem inakzeptablen Aktivitätsverlust oder zu unzureichender Solubilisierung der NAcT-Aktivität führten [Aigner, 1995]. Bei diesen Solubilisierungsversuchen wurden alle getesteten Detergenzien in 2,5-facher cmc eingesetzt.

Eine Möglichkeit, dieses Problem zu umgehen, stellen nichtdetergente Sulfobetaine dar. Deren Eigenschaften ermöglichen es, Detergenzien in geringeren Konzentrationen einzusetzen [Vuillard, 1991]. Nichtdetergente Sulfobetaine entfalten ihre Wirkung in molaren Konzentrationen.

Eingesetzt wurden entsprechend Tab. 5-1 die nichtdetergenten Sulfobetaine NDSB195, NDSB201 und NDSB256. Als Detergens wurde CHAPS gewählt, da dies in der Literatur als nichtdenaturierend und als nicht störend bei chromatographischen und elektrophoretischen Trennmethode beschrieben ist [Harris und Angal, 1986].

Bei diesen Untersuchungen wurde deutlich, daß alle eingesetzten nichtdetergenten Sulfobetaine in Verbindung mit CHAPS (Konzentration:  $1 \times \text{cmc}$ ) sowohl im Vergleich zu DesoxyBIGCHAP in 2,5 facher cmc, als auch in bezug auf CHAPS (Konzentration:  $1 \times \text{cmc}$ ) ohne NDSB-Zusatz in der Lage waren, die NAcT-Aktivität fast vollständig in Lösung zu bringen (vgl. Tab. 5-1). Bei NDSB195 konnte sogar eine Aktivitätssteigerung im Überstand beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, daß NDSB195 stabilisierend auf das Enzym wirkt. Ein derartiger Effekt ist für andere Proteine bereits beschrieben worden [Vuillard, 1991].

Der molare Zusatz von nichtdetergenten Sulfobetainen erhöhte die Viskosität der Lösung jedoch so stark, daß keine weiteren Reinigungsschritte, insbesondere chromatographische Techniken, durchgeführt werden konnten. Auch konnte aus der viskosen Proteinlösung mit Polyethylenglykol keine NAcT-Aktivität gefällt werden (Daten nicht gezeigt). Da keine ausreichenden Mengen von nichtdetergenten Sulfobetainen zur Verfügung standen, konnten weitere Untersuchungen nicht durchgeführt werden. Hier wäre es interessant zu untersuchen, inwieweit die Konzentration der nichtdetergenten Sulfobetaine herabgesetzt werden kann, um die oben beschriebenen positiven Effekte dieser Substanzklasse, bei gleichzeitiger Verringerung der Viskosität der Lösung, zu erhalten.

Bei diesen Untersuchungen zeigte sich außerdem, daß CHAPS, in einfacher cmc eingesetzt, vergleichbare Ergebnisse lieferte, wie diese mit DesoxyBIGCHAP erreicht werden konnten. Bei der Reinigung des Enzyms Acyl-CoA-Hydrolase aus Ratte ist bei der Erhöhung der Konzentration des Detergens über die einfache cmc auch, ähnlich wie bei der NAcT [Aigner, 1995], ein Verlust von Aktivität zu beobachten [Lehner und Kuksis, 1993].

Erneute Untersuchungen zur Solubilisierung der Aktivität aus Mikrosomen mit handelsüblichen Detergenzien bestätigten dieses Ergebnis (Tab. 5-2). CHAPS in einfacher cmc kann damit das Detergens DesoxyBIGCHAP ersetzen. Damit steht ein käufliches Detergens in gleichbleibender Qualität zur Verfügung, welches nicht die Nachteile von DesoxyBIGCHAP aufweist.

Da noch keine Daten über die Struktur der *N*-Acetyl-S-Transferase vorliegen, ist nicht bekannt, ob es sich bei dem Enzym um ein integrales, d. h. die Membran

durchspannendes Protein, oder um ein peripheres, an die Membran gelagertes oder darin verankertes Protein handelt.

Periphere Membranproteine können über einen sog. Phosphatidylinositol-Anker (PI-Anker) in der Membran verankert sein. Dieser Anker kann enzymatisch vom Protein hydrolysiert werden, so daß das Protein von der Membran gelöst wird. Das Enzym, das diese Hydrolyse katalysiert, ist die Phospholipase C.

Ob die NAcT über einen solchen Anker in die Membran gebunden ist, wurde mit einer Mikrosomensuspension und unterschiedlichen Zusätzen an Phospholipase C untersucht. Die Ergebnisse in Tabelle 5-3 zeigen, daß der Zusatz von Phospholipase C zu einem starken Aktivitätsverlust in der Mikrosomensuspension führt. Vor der Inkubation hatte die Suspension eine Aktivität von ca. 27 U/ml. Nach Abtrennen der unlöslichen Bestandteile befanden sich im Überstand ca. 3 U/ml. Erfolgte die Inkubation bei 30°C für drei Stunden, so befanden sich im Ansatz ohne Zusatz von Phospholipase C ca. 18 U/ml. Und in dessen Überstand ca. 1 U/ml. Hier trat ein deutlicher Verlust durch die Inkubation bei 30°C auf. Der Verlust der Aktivität betrug bis zu 75% bei den Ansätzen mit Phospholipase C. In den Überständen fand sich kaum noch Aktivität (maximal 0,1 U/ml). Es ist denkbar, daß die NAcT über einen PI-Anker an der Membran angelagert ist, es jedoch durch die Hydrolyse des Ankers an dem Protein zu Strukturänderungen kommt, die es inaktiviert. Eine abschließende Beurteilung ist allein durch diesen Befund jedoch nicht möglich.

Eine weitere Möglichkeit, Aussagen über die Bindung der NAcT an die Membran zu erhalten, ist das Lösungsverhalten des Proteins in Triton X-114. Dieses Detergens fällt aufgrund seines Wolkenpunktes bei 20°C aus, so daß sich in einem wäßrigen System zwei Phasen ausbilden. In der wäßrigen Phase reichern sich periphere Membranproteine an, in der Detergensphase die integralen Proteine.

Bei der NAcT handelt es sich aufgrund der Ergebnisse in Tabelle 5-4 um ein integrales, d. h. in die Membran eingelagertes Protein. 70% der Aktivität finden sich in der Detergensphase. Ca. 30% der Aktivität verbleiben in den nichtlöslichen Bestandteilen. Dies erklärt auch, warum mit Phospholipase C keine Aktivität freigesetzt wurde.

Eine Verwendung des Detergens Triton X-114 in den Puffern für die Teilreinigung der NAcT erscheint jedoch nicht sinnvoll, da sich Triton X-114 störend auf die Proteinbestimmung bei 280 nm auswirkt.

Der Ersatz des Detergens DesoxyBIGCHAP durch das Detergens CHAPS führte dazu, daß bei der Fällung der Proteine mit Polyethylenglykol eine Endkonzentration von 10% Polyethylenglykol ausreichend war, um die Aktivität fast vollständig zu fällen. Da die Ausbeute an gefälltem Protein im Vergleich zu DesoxyBIGCHAP abnimmt, bedeutet dies, daß weniger Protein aus CHAPS-haltiger Lösung ausgefällt wird.

Proteine, die über eine Nukleotid-Bindetasche verfügen, lassen sich mit Farbstoffen wie z. B. Coomassie Brilliant Blau oder Cibacron blue F3GA inhibieren. Diese Farbstoffe lagern sich in die Bindetasche ein und verhindern somit eine Bindung des Substrates oder des Kosubstrates. Von der NAcT ist bekannt, daß das Enzym u. a. von Coomassie Brilliant Blau inhibiert wird [Jäger, 1993]. Ein Säulenmaterial, welches die Eigenschaften eines Anionenaustauschers und die des Farbstoffes Cibacron F3GA verbindet, wurde eingesetzt, um einen stärkeren Reinigungseffekt zu erzielen. Es wurde unter den

gleichen Bedingungen eluiert, wie dies bereits für den ersten chromatographischen Schritt der Teilreinigung der NAcT [Aigner, 1995] beschrieben wurde. DesoxyBIGCHAP wurde durch CHAPS in einfacher cmc ersetzt.

Protein eluierte in zwei Signalen von der Säule. Das erste Signal eluierte im aufsteigenden KCl-Gradienten (ohne Detergens), das zweite Signal eluierte bei der Stoßelution mit TDG-Puffer, pH 7,8 (mit CHAPS). Das Elutionsprofil (Abb. 5-8) gleicht den früheren Ergebnissen der DEAE-Anionenaustauschchromatographie [Jäger, 1993; Aigner, 1995], jedoch lassen sich höhere spezifische Aktivitäten in den Spitzenfraktionen beider Signale erkennen: so wurden früher nur 1,6 bzw. 1,1 U/mg gemessen, während unter Verwendung von CHAPS-haltigem Puffer und dem kombinierten Säulenmaterial fast eine Verdreifachung erreicht werden konnte.

Beide Signale wurden in einem SDS-Gel analysiert. Abb. 5-9 zeigt, daß kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Signalen zu erkennen ist. Die Steigerung der spezifischen Aktivität gegenüber der alten Methode stellt damit keinen deutlichen Vorteil dar. Zumal auch nach dem neuen Verfahren nur ca. 1/3 der Aktivität im zweiten Signal eluiert. 2/3 der Aktivität stellten Verlust dar, somit ist der Vorteil des DEAE-Affigel blue-Säulenmaterials eher als gering zu beurteilen.

Um alleine die Adsorptionseigenschaften des Farbstoffes zu testen, wurde Affigel blue-Säulenmaterial ohne zusätzliche Ionentauschereigenschaften eingesetzt und das Protein aus gelöstem Polyethylenglykol-Sediment im Batchverfahren an Affigel blue-Säulenmaterial gebunden. Nach dem Waschen des Materials wurde mit einem Puffer, der 1 mM CoA enthielt, eluiert. Durch Absorptionsmessung der Lösungen bei 280 nm konnte keine Proteinbindung an dem Säulenmaterial nachgewiesen werden. Auch ließ sich nur in einer Fraktion eine geringe Aktivität nachweisen. Die eluierten Fraktionen wurden jedoch eingeeengt und in einem SDS-Polyacrylamidgel analysiert. Von dem Elektrophoretogramm des Gels wurde anschließend eine Probenspur abgetrennt und mit NAcT-spezifischen Antikörpern immungefärbt. In der Abb. 5-14 ist zu erkennen, daß sowohl bei 34 kDa als auch bei 68 kDa ein Protein angefärbt wurde. Dies deckt sich mit früheren Ergebnissen, aus denen abgeleitet wurde, daß die NAcT auch in dimerer Form vorliegt [Aigner, 1995].

Die entsprechenden Proteine wurden aus dem zweiten Teil des mit Coomassie Brilliant Blau gefärbten Elektrophoretogramms ausgeschnitten und sequenziert. Das durch die Antikörper am stärksten angefärbte Protein bei 68 kDa konnte nicht sequenziert werden. Dies kann bedeuten, daß das Protein N-terminal blockiert ist. Interessant ist jedoch, daß die Immunfärbung deutlich intensiver ist, als die Färbung des gleichen Proteins mit Coomassie Brilliant Blau. Es scheint hier eine sehr starke Wechselwirkung zwischen Antikörper und 68 kDa Protein vorzuliegen.

Deutlich schwächer wurde das Protein bei 34 kDa gefärbt. Hier zeigt sich nur eine dünne Bande als Signal. Das entsprechende Protein konnte aus dem mit Coomassie Brilliant Blau gefärbten Elektrophoretogramm ausgeschnitten und sequenziert werden.

Die Sequenz der ersten 20 Aminosäuren des Proteins zeigt in Position 11 bis 20 eine Übereinstimmung zu den Aminosäuren 46 bis 55 des ERp31 aus Mensch. Dieser Sequenzabschnitt ist zu 90% identisch zu ERp31. Bei dem Protein ERp31 handelt es sich um ein Protein des endoplasmatischen Reticulums mit einer Molmasse von 31 kDa mit bisher unbekannter Funktion. Aufgrund der Position der Übereinstimmung innerhalb

des ERp31 ist es jedoch unwahrscheinlich, daß es sich bei dem sequenzierten Protein um das ERp31 handelt.

Eine weitere Übereinstimmung läßt sich zu dem Proteinkinase C Inhibitor aus Mensch finden (Position 1 - 20). Die übereinstimmenden Aminosäuren der Proteinkinase C sind die Aminosäuren 6 - 20. Der Proteinkinase C Inhibitor aus Mensch ist weiterhin cytosolisch lokalisiert, so daß auch dies gegen diese Zuordnung der Datenbankabfrage spricht.

Die sequenzierte Teilsequenz läßt sich somit keinem bekannten Protein zuordnen. Auch eine Datenbankabfrage in bezug auf konservierte Domänen lieferte kein Ergebnis. Hier wäre es denkbar, daß insbesondere die Aminosäuren ab Position 13 der Teilsequenz einer solchen Domäne zuzuordnen wären, da hier eine Übereinstimmung mit ERp31 und dem Proteinkinase C Inhibitor vorliegt. Häufig zeichnen sich Proteinfamilien durch solch konservierte Domänen aus, bzw. kann man solchen Domänen bestimmte Funktionen zuordnen. Dies ist jedoch für die Teilsequenz nicht möglich.

Es läßt sich abschließend nicht sagen, ob die erhaltene Teilsequenz der NAcT zuzuordnen ist. Hierzu müßten mehr Sequenzinformationen vorliegen, bzw. das Protein müßte bis zur Homogenität gereinigt sein, um seine Funktion durch einen Aktivitätstest belegen zu können.

Um den Schritt der Polyethylenglykolfällung und die nachfolgende DEAE-Anionenaustauschchromatographie im bestehenden Reinigungsverfahren zu ersetzen, wurde Resource Q-Säulenmaterial verwendet. Aufgrund der hohen Bindekapazität des Materials wurde der Überstand aus einem Mikrosomenaufschluß aufgetragen. Eluiert wurde im aufsteigenden, nichtlinearen KCl-Gradienten (0-1 M), Plateaus wurden manuell eingefügt.

Es konnten 6 Signale eluiert werden, von denen die ersten drei Signale 87% der aufgetragenen Aktivität enthielten. Die gesamte Aktivität war mit den ersten vier Signalen assoziiert. Im zweiten Signal fand sich die höchste spezifische Aktivität. Hier konnte auch der größte Reinigungseffekt erzielt werden. Es fand eine 10-fache Reinigung statt.

Die Fraktionen mit den höchsten spezifischen Aktivitäten der Signale 1 - 3 wurden eingengt und durch zweidimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert. Ein Vergleich der Gele untereinander zeigt, daß im Bereich von 34 kDa verschiedene Proteine zu erkennen sind. Während diese Proteine sich in den Gelen der Signale 1 und 3 nur diffus erkennen lassen, sind diese im Gel des Signals 2 gut getrennt.

Die Proteine aus den Gelen wurden auf PVDF-Membran transferiert und aus dem Blot des Signals 2 wurden verschiedene Proteine sequenziert. Ausgewählt wurden Proteine, die eine Molmasse im Bereich von 34 kDa bzw. oberhalb 66 kDa aufwiesen und in ausreichender Menge vorlagen.

Es konnten drei Proteine sequenziert werden. Bei dem Protein, welches bei 34 kDa in dem Gel erscheint, handelt es sich wahrscheinlich um die b-Kette des Tropomyosins.



Die Datenbankabfrage zeigt eine 80%ige Übereinstimmung zu der erhaltenen Sequenz. Dieses Protein spielt eine Rolle bei der Muskelkontraktion und ist ein Heterodimer mit einer Molmasse vom 66 kDa. Die  $\beta$ -Kette hat eine Molmasse von 35 kDa. Aufgrund der hohen Übereinstimmung der Sequenz zu der Datenbankabfrage ist es auszuschließen, daß es sich bei diesem Protein um die NAcT handelt.

Eine weitere Peptidsequenz, die erhalten wurde, konnte aus einem Signal bei ca. 66 kDa ermittelt werden. Diese Teilsequenz zeigt eine 91%ige Homologie zu einem Membranprotein, der ER-60 Protease (auch bezeichnet als ERp61, HIP70, Q2, GRP58 und GRP57) aus Maus. Die Protease ist eine Cystein-Protease und hydrolysiert residente ER-Proteine. Ein Bereich (Position 2 - 8) der Teilsequenz findet sich auch in einem Peptid der Carnithin-Acetyltransferase I aus Ratte.

Eine dritte erhaltene Teilsequenz zeigt eine 100%ige Übereinstimmung zu einem weiteren Protein. Dabei handelt es sich um das sogenannte BIP (GRP78, HSP70), ein Protein, welches die schwere Kette von IgGs bindet. Dieses Protein ist im endoplasmatischen Reticulum lokalisiert, gehört zu der Klasse der Chaperone und hat eine Molmasse von ca. 70 kDa. Auch hier ist auszuschließen, daß es sich um die dimere Form der NAcT handelt.

Die dargestellten säulenchromatographischen Verfahren führten zu keiner Verbesserung der Teilreinigung der NAcT. Es konnten auch keine Sequenzdaten erhalten werden, die der NAcT zugeordnet werden könnten. Die Aktivität der NAcT war, wie auch bei der bestehenden Teilreinigung, bei allen Verfahren mit mehr als einem Signal assoziiert. Dies deutet darauf hin, daß das Enzym in den Lösungen mit anderen Proteinen zusammengelagert sein könnte. Für die Ermittlung von Proteinsequenzdaten ist damit die 2D-Elektrophorese die geeignetste Methode. Deren Leistungsfähigkeit erlaubt es, die teilgereinigte Fraktion zu analysieren. Dazu müßten die in dem Gel getrennten Proteine sequenzspezifisch hydrolysiert werden und wären modernen Verfahren wie MALDI-MS zugänglich.

Die Acetylierung von Cystein-S-Konjugaten stellt einen entscheidenden Schritt bei der Entgiftung von halogenierten Alkanen und Alkenen dar. Dieser Schritt ist jedoch nicht irreversibel. Eine Desacetylase kann gebildete Mercaptursäuren deacetylieren und somit die korrespondierenden Cystein-S-Konjugate formieren. Die gebildeten Cystein-S-Konjugate können durch eine  $\beta$ -Lyase zu nephrotoxischen Metaboliten umgesetzt werden. Die Balance zwischen acetylierten und deacetylierten Cystein-S-Konjugaten stellt somit ein entscheidendes Kriterium für die Nephrotoxizität von halogenierten Alkanen und Alkenen dar. Eine Kenntnis der kinetischen Größen  $K_m$  und  $V_{max}$  für die Acetylierungsreaktion ist für die Beurteilung der Toxizität von halogenierten Alkanen und Alkenen von praktischer Bedeutung.

Für die Bestimmung der kinetischen Größen  $K_m$  und  $V_{max}$  von verschiedenen halogenierten Cystein-S-Konjugaten war es notwendig, interferierende Enzymaktivitäten abzutrennen. Störend wirken sich die Enzyme Desacetylase und Acetyl-CoA-Hydrolase aus. Letzteres hydrolysiert das im Aktivitätstest eingesetzte Cosubstrat der NAcT, Acetyl-CoA.

Besonders störend wirkten sich die interferierenden Enzymaktivitäten aus, wenn die Mikrosomen nach der Methode von Duffel und Jakoby [1982] präpariert wurden. Dies zeigten Produktinhibitionsstudien an der NAcT [Jäger, 1993]. Ein weiterer Hinweis auf

das Stören der Bestimmung von  $K_m$ -Werten durch andere Enzyme zeigt sich in der Steigerung des  $K_m$ -Wertes für das Substrat S-(4-Nitrobenzyl)-L-cystein bei steigendem Reinheitsgrad der NAcT [Aigner et al., 1994]. Diese Beobachtung ist vermutlich auf die Abtrennung der Desacetylase im Fortgang der Reinigung zurückzuführen.

Auch bei der Bestimmung der  $K_m$ -Werte für die Acetylierung der Substrate S-(1,2-Dichlorvinyl)-L-cystein (**2b**) und S-(1,2,3,4,4-Pentachlorbutadienyl)-L-cystein (**2a**) scheint es zu Störungen durch eine Desacetylaseaktivität zu kommen. Die Acetylierung soll in Leber- und Nierenmikrosomen von einem Enzym katalysiert werden, wie die monophasische Eadie-Hofstee-Auftragungen zeigen [Birner et al., 1997]. Weiterhin soll es sich in Niere und Leber um das gleiche Enzym handeln. Die  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Werte differieren jedoch 5 bzw. 20fach. Für diese Unterschiede ist vermutlich neben der Anwesenheit oder Abwesenheit von inhibierenden oder aktivierenden Faktoren die unterschiedliche Desacetylaseaktivität in Leber- und Nierenmikrosomen verantwortlich.

Um die störenden Aktivitäten in den Enzymfraktionen beurteilen zu können, wurden Aktivitätstests für Desacetylase und Acetyl-CoA-Hydrolase etabliert. Diese Tests wurden unter den für die NAcT optimierten Bedingungen durchgeführt und konnten automatisiert werden.

Der Aktivitätstest für Desacetylase beruht im wesentlichen auf dem HPLC-gestützten Test für NAcT [Aigner et al., 1994]. Als Substrat wurde das acetylierte Produkt von S-(4-Nitrobenzyl)-L-cystein eingesetzt. Es mußten somit keine weiteren Veränderungen des bereits etablierten Aktivitätstests vorgenommen werden, da sich die Signale des Eduktes, S-(4-Nitrobenzyl)-L-cystein, und des Produktes *N*-Acetyl-S-4-nitrobenzyl-L-cystein nicht überlagerten. Die Auswertung erfolgte über die Fläche des Signales und einer Eichkurve, die die Signalfäche und die Menge an gebildetem S-(4-Nitrobenzyl)-L-cystein in Bezug setzte.

Die Elutionsbedingungen des Aktivitätstests für NAcT eigneten sich nicht für die Trennung der Signale von Acetyl-CoA und CoA. Dies war für den Aktivitätstest der Acetyl-CoA-Hydrolase notwendig, da die Bestimmung der Aktivität über die gebildete Menge von CoA erfolgen sollte, sich jedoch die Signale beider Verbindungen unter den Bedingungen für die NAcT überlagerten. Es wurde ein HPLC-gestütztes Trennverfahren für verschiedene CoA-Derivate [Rajgarhia et al., 1995] derart modifiziert, daß alle Edukt- und Produktsignale getrennt werden konnten. Auch hier erfolgte die Quantifizierung über eine Eichkurve, die die gebildete Menge vom CoA mit der Fläche des Signals in Bezug setzte.

Mit der Etablierung beider Aktivitätstests standen zum einen Testverfahren zur Verfügung, die automatisiert und somit schnell durchzuführen waren, und zum anderen konnten die störenden Enzymaktivitäten unter den herrschenden optimalen Bedingungen für NAcT beurteilt werden.

Die Solubilisierung der NAcT-Aktivität und die Abtrennung der störenden Enzymaktivitäten von Desacetylase und Acetyl-CoA-Hydrolase konnte durch Solubilisieren mit DesoxyBIGCHAP, Polyethylenglykol-Fällung und anschließender Chromatographie mit Hydroxyapatit erreicht werden [Duffel und Jakoby, 1982]. Dieses Teilreinigungsverfahren führte jedoch zu substantiellem Aktivitätsverlust der NAcT.

Ein in dieser Arbeit etabliertes, neues Teilreinigungsverfahren zeichnet sich durch die Abtrennung der Desacetylaseaktivität und die Reduktion der Acetyl-CoA-Aktivität um ca. 2/3 aus. Weiterhin konnte vollständig auf chromatographische Schritte verzichtet werden.

Für die Bestimmung der  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Werte für die Acetylierungsreaktion von verschiedenen Haloalkyl- und Haloalkenyl-Cystein-S-Konjugaten (freundlicherweise von Dr. M. W. Anders, Rochester, NY, USA zur Verfügung gestellt) mußte der etablierte radioaktive Aktivitätstest [Aigner et al., 1994] modifiziert werden. Da die vorhandene Acetyl-CoA-Hydrolaseaktivität die Konzentration des Cosubstrates der NAcT reduziert, wurde dem Testansatz Acetyl-CoA im 10fachen Überschuß zugegeben. Aus Gründen der Wirtschaftlichkeit wurde  $^{14}\text{C}$ -markiertes Acetyl-CoA zu einem Zehntel des im Test vorhandenen Acetyl-CoA zugegeben. Der Ersatz des Detergens DesoxyBIGCHAP durch das Detergens CHAPS in den Lösungen der Enzympräparation machte es notwendig, die bei der Dünnschichtchromatographie verwendeten mobilen Phase zu ersetzen. Mit der bisher verwendeten mobilen Phase konnte keine Trennung der radiaktiven Produkte erreicht werden. Ein Gemisch aus Isoamylalkohol, Essigsäure und Wasser im Verhältnis 3:2:1 lieferte auswertbare Ergebnisse.

Die Quantifizierung erfolgte densitometrisch. Dazu wurde der exponierte Röntgenfilm digital erfaßt und die Produktsignale, wie auch die Signale eines Standards, wurden mit Hilfe eines geeigneten Computerprogramms ausgewertet.

Mit Ausnahme des Substrates S-[2-(Fluormethoxy)-1,3,3,3-tetrafluor-1-propenyl]-L-cystein (**2c**) konnte eine Acetylierung durch NAcT beobachtet werden. Die Unzugänglichkeit des Substrats **2c** liegt vermutlich an dessen schneller Zyklisierung zu 2-[1-(Fluormethoxy)-2,2,2-trifluorethyl]-4,5-dihydro-1,3-thiazol-4-carbonsäure [Iyer und Anders, 1997]. Dies erklärt auch, warum Substrat **2c** in Ratten nicht nephrotoxisch ist. Das zyklische Thiazol ist kein Substrat für  $\beta$ -Lyase [Iyer et al., 1997] und kann somit nicht zu toxischen Metaboliten umgewandelt werden.

Während die  $K_m$ -Werte für die übrigen untersuchten Cystein-S-Konjugate maximal um den Faktor 2 variierten, differierten die  $V_{max}$ -Werte bis zu 20fach.

Der Quotient aus  $V_{max}$  und  $K_m$  stellt ein Maß für die Rate der Acetylierung dar. Für S-(2-Halo-1,1,2-trifluorethyl)-L-cystein-Konjugate steigt sie in der Reihenfolge Br (**1c**) > Cl (**1b**) > F (**1a**). Weiterhin zeigt sich eine gute Korrelation des Quotienten  $V_{max}/K_m$  mit der molaren Refraktivität als Maß für das molare Volumen und der Hydrophobizität ( $\log P$ ) der Verbindung. Die Substrate **1d**, **1e** und **2b** zeigen eine sehr gute Korrelation bei diesen Darstellungen.

Die Rate der Acetylierung folgt der Reihe **1d** > **1b**  $\approx$  **1a**, während die Cytotoxizität in isolierten Zellen der proximalen Tubuli der Reihe **1a**  $\approx$  **1b** > **1d** folgt [Boogard et al., 1989]. Hier zeigt sich der unmittelbare Zusammenhang zwischen der N-Acetylierungsrate und der Cytotoxizität. Die Verbindung, die am schnellsten acetyliert wird, wird auch am schnellsten ausgeschleust und steht somit der  $\beta$ -Lyase als Substrat nicht mehr zur Verfügung. Im Gegensatz zu Boogard et al. [1989] konnte hier die Acetylierung der Substrate **1a** und **1b** nachgewiesen werden.

Ein wesentlicher Punkt, der vermutlich die Cytotoxizität einer Verbindung bestimmt, ist die Rate der Desacetylierung durch das Enzym Desacetylase. Boogard et al. [1989]

fanden, daß die Rate der Desacetylierung in proximalen Tubuli-Zellen der Reihe **1a**  $\approx$  **1b** > **1d** folgt. Dies weist darauf hin, daß Bedingungen, die eine hohe intrazelluläre Konzentration begünstigen, mit einer hohen Cytotoxizität assoziiert sind. Gestützt wird diese These von Beobachtungen durch Commandeur et al. [1988], die den Metabolismus von *N*-(Trideuteroacetyl)-L-cystein-S-Konjugaten von 2,2-Difluorethylenen in Ratte untersuchten. Nach intraperitonealer Verabreichung von *N*-(Trideuteroacetyl)-markiertem Mercapturat der Verbindung **1d**, wurden 31% der verabreichten Dosis unverändert und 28% als unmarkierte Mercaptursäure ausgeschieden. Dies zeigt eine intensive Desacetylierung und Acetylierung *in vivo*. Bei Verabreichung von markierten Mercapturaten der Verbindungen **1a** und **1b** wurden dagegen weniger als 1% als markierte und weniger als 2% als unmarkierte Mercapturate ausgeschieden. D. h. bei diesen Verbindungen liegt das Gleichgewicht auf der Seite der Desacetylierung.

Die hier dargestellten kinetischen Daten der Verbindungen korrelieren mit deren Cytotoxizität. Da die kinetischen Größen der untersuchten Cystein-S-Konjugate die gleichen Größenordnungen haben, ist deren Cytotoxizität wahrscheinlich hauptsächlich durch die Desacetylierungsrate der korrespondierenden Mercapturate bestimmt. Liegt das Gleichgewicht auf der Seite der Desacetylierung, so werden die Verbindungen langsamer über die Nieren ausgeschieden und stehen dem Enzym  $\beta$ -Lyase als Substrat in ausreichenden Mengen zur Verfügung.

Ein weiterer Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war die Ermittlung von Teilsequenzen vom *N*-Acetyl-S-Transferase-positiven Phagenklonen. Von diesen Teilsequenzen waren weder Leserichtung noch Leseraster bekannt.

Die Sequenzierung ergab, daß die Sequenzen der Phagenklone E, G und H überlappenden Teilsequenzen entsprachen und diese Klone somit für das gleiche Genprodukt codierten. Nach computergestützter Analyse konnte ein 1699 Basen umfassender offener Leserahmen mit hoher Expressionswahrscheinlichkeit ermittelt werden. Ein 1025 Basen umfassender offener Leserahmen ergab sich für Klon A, der, wie auch Klon C, für andere Genprodukte codiert. Ein Leserahmen für Klon C konnte nicht ermittelt werden, da dieser Phagenklon nicht vollständig sequenziert wurde.

Bei der abgeleiteten Aminosäuresequenz des Phagenklons A ergab eine Datenbankabfrage, daß das durch diesen Leserahmen codierte Protein hohe Homologien zu einer Tyrosyl-tRNA-Synthetase aus verschiedenen Organismen aufweist. Neben einer hohen Identität der Aminosäuresequenz konnten zwei für Tyrosyl-tRNA-Synthetasen typische Sequenzmotive identifiziert werden. Dies legt nahe, daß es sich bei dem durch die cDNA-Insertion des Phagenklons A codierte Protein nicht um die NAcT handelt. Da jedoch keine Sequenzdaten von Tyrosyl-tRNA-Synthetasen aus Säugern vorliegen, ist eine Aussage in bezug auf Homologien zwischen Phagenklon A und dieser Teilsequenz nur bedingt möglich.

Die cDNA Teilsequenzen aus dem Phagenklon C zeigten eine große (81%) Homologie zu einer Leucyl-tRNA-Synthetase aus *Bacillus subtilis*. Auf eine vollständige Sequenzierung des Klons wurde daher verzichtet. Aufgrund der hohen Übereinstimmung der DNA-Sequenzen mit der Leucyl-tRNA-Synthetase-Sequenz aus *B. subtilis* ist es nicht wahrscheinlich, daß die cDNA des Phagenklons C für NAcT codiert.

Die sich durch die überlappenden Teilsequenzen der Phagenklone E, G und H ergebende cDNA-Sequenz zeigt eine sehr hohe Homologie zur Untereinheit M des Typus I Restriktionsenzym *Eco* R124/3 I. Aufgrund weiterer Homologien zu ähnlichen Proteinen aus *Helicobacter pylori*, *Mycoplasma pneumoniae* und weiteren Organismen, handelt es sich hier vermutlich nicht um eine die NAcT-codierende Sequenz, sondern um „Artefakte“ aus *E. coli* in der cDNA-Expressionsbank.

Ein Vergleich aller Teilsequenzen untereinander ergab ebenfalls keine Homologien, so daß anhand eines gemeinsamen Sequenzmotives keine Aussage bezüglich der Epitoperkennung der Antikörper gemacht werden kann. Allen Proteinen, die Homologien zu den erhaltenen Sequenzen zeigen, ist jedoch eine ATP-Bindestelle und die Eigenschaft gemeinsam, daß sie DNA bzw. RNA binden. Daraus läßt sich schließen, daß die NAcT-spezifischen Antikörper wahrscheinlich gegen eine Struktur gerichtet sind, die ATP oder Nukleotide erkennt.

Die Antikörper gegen die NAcT sind zur Durchmusterung von cDNA-Expressionsbanken nicht geeignet. Um Sequenzdaten der NAcT zu erhalten, müßte die Reinigungsstrategie soweit optimiert werden, daß am Ende der Reinigung die NAcT aktiv und homogen vorliegt.

Liegen Sequenzinformationen der NAcT vor, so können Aussagen mit Hilfe eines Datenbankabgleiches über gemeinsame Struktur motive der durch die cDNA-Insertionen codierten Proteine, aber auch der auf Proteinebene sequenzierten Enzyme, gemacht werden. Da es sich wahrscheinlich bei der NAcT um ein integrales Membranprotein handelt, erkennen die Antikörper vermutlich eine exponierte Stelle des Proteins, wie z. B. die Nukleotidbindetasche. Die Analyse dieser Bereiche auf Sequenzebene erlaubt es, zwischen konservierten und nicht konservierten Regionen zu unterscheiden. Mit Hilfe der nichtkonservierten Regionen können dann NAcT-spezifische Peptidantikörper gewonnen werden. Die Antikörper können für weitere Analysen, wie z. B. die Lokalisierung des Enzyms in Zellen, und für die Reinigung des Proteins bis zur Homogenität eingesetzt werden.

## 7. Literatur

Aigner, A. (1995)

„Transport- und Entgiftungswege an der Blut-Hirn-Schranke: Reinigung, Charakterisierung und Lokalisation der Cystein-S -Konjugat-spezifischen *N*-Acetyl-S -Transferase des Schweins“

Dissertation, TH Darmstadt.

Aigner, A., Jäger, M., Pasternack, R., Weber, P., Wienke, D. und Wolf, S. (1996)

„Purification and Characterization of Cysteine-S -Conjugate *N*-Acetyltransferase from Pig Kidney“

Biochem. J. **317**, 213-218.

Aigner, A., Jäger, M., Weber, P. und Wolf, S. (1994)

„A Nonradioactive Assay for Microsomal Cysteine-S -conjugate *N*-Acetyltransferase Activity by HPLC“

Anal. Biochem. **223**, 227-231.

Anders, M. W. (1991)

„Metabolism and toxicity of hydrochlorofluorocarbons: current knowledge and needs for the future“

Environ. Health. Perspect. **96**, 185-191.

Anders, M. W., Lash, L., Dekant, W., Elfarra, A. A. und Dohn, D. R. (1988)

„Biosynthesis and Biotransformation of Glutathione S -Conjugates to Toxic Metabolites“  
CRC Crit. Rev. Toxicol. **18** (4), 311-341.

Anderson, P. M. und Schultze, M. O. (1965)

„Interactions of S -(1,2-dichlorovinyl)-L-cysteine with proteins“

Arch. Biochem. Biophys. **109**, 615-621.

Bachi, M. D. und Ross-Petersen, K. J. (1972)

„The Stepwise Removal of the S -p-Nitrobenzyl Protecting Group“

J. Org. Chem. **37**, 3551-3552.

Bakke, J. E. und Gustafson, J. A. (1984)

„Mercapturic acid pathway metabolites of xenonotics: generation of potentially toxic metabolites during enterohepatic circulation“

Trends Pharmacol. Sci. **1984** (12), 517-521.

Bakke, J. E., Rafter, J. J., Lindeskog, P., Feil, V. J., Gustafsson, J.-A. und Gustafsson, B. E. (1981)

„Metabolism of 2-acetamido-4-(chloromethyl)thiazole in germ-free and conventional rats“

Biochem. Pharmac. **30**, 1839-1844.

Benner, K.-U. (1996)

„Der Körper des Menschen“

Weltbild Verlag GmbH, Augsburg.

- Bhattacharya, R. K. und Schultze, M. O. (1972)  
„Properties of DNA treated with S -(1,2-dichlorovinyl)-L-cysteine and a lyase“  
Arch. Biochem. Biophys. **153**, 105-115.
- Birgersson, B., Sterner, O. und Zimerson, E. (1988)  
„Chemie und Gesundheit“  
VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
- Blum, M., Beier, H. und Gross, H. J. (1987)  
„Improved silverstaining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamid gels“  
Electrophoresis **8**, 349-351.
- Blum, M., Demierre, A., Grant, D. M., Heim, M. und Meyer, U. A. (1991)  
„Molecular mechanism of slow acetylation of drugs and carcinogens in humans“  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**, 5237-5241.
- Blum, M., Grant, D. M., McBride, W., Heim, M. und Meyer, U. A. (1990)  
„Human Arylamine N -acetyltransferase genes: isolation, chromosomal localisation, and functional expression“  
DNA Cell Biol. **9**, 192-203.
- Boogaard, P. J., Commandeur, J. N. M., Mulder, G. J., Vermeulen, N. P. E. und Nagelkerke, J. F. (1989)  
„Toxicity of the cysteine-S -conjugates and mercapturic acids of four structurally related difluoroethylenes in isolated proximal tubular cells from rat kidney. Uptake of the conjugates and activation to toxic metabolites“  
Biochem. Pharmacol. **38**, 3731-3741.
- Bordier, C. (1981)  
„Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution“  
J. Biol. Chem. **246**, 1604-1607.
- Bremer, J. und Greenberg, D. M. (1961)  
„Enzymatic methylation of foreign sulphydryl compounds“  
Biochim. Biophys. Acta **46**, 217-225.
- Bucher, O. und Wartenberg, H. (1989)  
„Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen“  
Hans Huber Verlag, Bern.
- Cao, X. und Brosius, F. C. (1993)  
„Direct sequencing of double-stranded PCR products isolated from conventional agarose gels“  
Biotech. **15** (3), 384-386.
- Capdevila, J. H., Wie, S., Yan, J., Karara, A., Jacobson, H. T., Falck, J. R., Guengerich, F. P. und DuBois, R. N. (1992)  
„Cytochrome P-450 arachidonic acid epoxygenase. Regulatory control of the renal epoxygenase by dietary salt loading“  
J. Biol. Chem. **267**, 21720-21726.

Chasseaud, L. F. (1974)

„Nature and distribution of enzymes catalyzing the conjugation of glutathione with foreign compounds“

Drug. Metab. Rev. **2**, 185-219.

Chasseaud, L. F. (1980)

„Extrahepatic conjugation with glutathione“

Monogr. Pharmacol. Physiol. **5**, 427-452.

Chen, C., Chin, J. E., Ueda, K., Clark, D. P., Pastan, I., Gottesman, M. M. und Roninson, I. B. (1986)

„Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr 1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells“

Cell **47**, 381-389.

Commandeur, J. N. M., Boogard, P. J., Mulder, G. J. und Vermeulen, N. P. E. (1991a)

„Mutagenicity and cytotoxicity of two regioisomeric mercapturic acids and cysteine S-conjugates of trichloroethylene“

Arch. Tox. **65**, 373-380.

Commandeur, J. N. M., Stijntjes, G. J., Wijngaard, J. und Vermeulen, N. P. E. (1991b)

„Metabolism of L-Cysteine S-Conjugates and N-(Trideuteroacetyl)-L-Cysteine S-Conjugates of Four Fluoroethylenes in the Rat“

Biochem. Pharmacol. **42** (1), 31-38.

Cordon-Cardo, C., O'Brien, J. P., Casals, D., Rittman-Grauer, L., Biedler, J. L., Melamed, M. R. und Bertino, J. R. (1989)

„Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites“

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86**, 695-698.

Coroneos, E., Gordon, J. W., Kelly, S. L., Wang, P. D. und Sim, E. (1991)

„Drug metabolising N-acetyltransferase activity in human cell lines“

Biochem. Biophys. Acta **1073**, 593-599.

Daly, A. K. (1995)

„Molecular basis of polymorphic drug metabolism“

J. Mol. Med. **73**, 539-553.

Dekant, W., Berthold, K., Vamvakas, S. und Henschler, D. (1988d)

„Thioacylating agents as ultimate intermediates in the  $\beta$ -lyase catalyzed metabolism of S-(pentachlorobutadienyl)-L-cysteine“

Chem. Bio. Inter. **67**, 139-148.

Dekant, W., Berthold, K., Vamvakas, S., Henschler, D. und Anders, M. W. (1988c)

„Thioacylating intermediates as metabolites of S-(1,2-dichlorovinyl)-L-cysteine and S-(1,2,2-trichlorovinyl)-L-cysteine formed by cysteine conjugate  $\beta$ -lyase“

Chem. Res. Tox. **1**, 175-178.



- Dekant, W., Lash, L. H. und Anders, M. W. (1987)  
„Bioactivation mechanism of the cytotoxic and nephrotoxic S-conjugate S-(2-chloro-1,1,2-trifluoroethyl)-L-cysteine“  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**, 7443-7447.
- Dekant, W., Schrenk, D., Vamvakas, S. und Henschler, D. (1988a)  
„Metabolism of hexachloro-1:3-butadiene in mice: *in vivo* and *in vitro* evidence for activation by glutathione conjugation“  
Xenobiotica **18**, 803-816.
- Dekant, W., Urban, G., Görsman, C. und Anders, M. W. (1991)  
„Thioketene formation from  $\alpha$ -haloalkenyl 2-nitrophenyl disulfides: models for biological reactive intermediates of cytotoxic S-conjugates“  
J. Am. Chem. Soc. **113**, 5120-5122.
- Dekant, W. und Vamvakas, S. (1993)  
„Mechanisms of xenobiotic-induced renal carcinogenicity“  
Adv. Pharmacol. **23**, 297-337.
- Dekant, W., Vamvakas, S. und Anders, M. W. (1989)  
„Bioactivation of nephrotoxic haloalkenes by glutathione conjugation: formation of toxic and mutagenic intermediates by cysteine conjugate  $\beta$ -lyase“  
Drug Metab. Rev. **20**, 43-83.
- Dekant, W., Vamvakas, S., Berthold, K., Schmidt, S., Wild, D. und Henschler, D. (1986)  
„Bacterial  $\beta$ -lyase mediated cleavage and mutagenicity of cysteine conjugates derived from the nephrocarcinogenic alkenes trichloroethylene, tetrachloroethylene and hexachlorobutadiene“  
Chem. Biol. Inter. **60**, 31-45.
- Dekant, W., Vamvakas, S., Henschler, D. und Anders, M. W. (1988b)  
„Enzymatic conjugation of hexachloro-1,3-butadiene with glutathione: formation of 1-(glutathion-S-yl)-1,2,3,4,4-pentachlorobuta-1,3-diene and 1,4-bis(glutathion-S-yl)-1,2,3,4-tetrachlorobuta-1,3-diene“  
Drug Met. Dis. **16**, 701-706.
- Dohn, D. R. und Anders, M. W. (1982)  
„A simple assay for cysteine conjugate  $\beta$ -lyase activity with S-(2-benzothiazolyl)-L-cysteine“  
Anal. Biochem. **120**, 379-386.
- Dohn, D. R. und Casida, J. E. (1987)  
„Thiiranium ion intermediates in the formation and reaction of S-(2-haloethyl)-L-cysteines“  
Bioorg. Chem. **15**, 115-124.
- Duffel, M. W. und Jakoby, W. B. (1982)  
„Cysteine S-Conjugate N-Acetyltransferase from Rat Kidney Microsomes“  
Mol. Pharmacol. **21**, 444-448.

- Duffel, M. W. und Jakoby, W. B. (1985)  
„Cysteine S -Conjugate N -Acetyltransferase“  
Meth. Enzymol. **113**, 516-520.
- Dupret, J.-M., Goodfellow, G. H., Janezic, S. A. und Grant, D. M. (1994)  
„Structure-Function Studies of Human Arylamine N -Acetyltransferase NAT1 and NAT2“  
J. Biol. Chem. **269** (43), 26830-26835.
- Endicott, J. A. und Ling, V. (1989)  
„The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance“  
Annu. Rev. Biochem. **58**, 137-171.
- Evans, D. A. P. (1989)  
„N -acetyltransferases“  
Pharmacol. Ther. **42**, 157-234.
- Gonzalez, F. J. (1992)  
„Human cytochromes P450: Problems and prospects“  
Trends Pharmacol. **13**, 346-352.
- Grafström, R., Ormstad, K., Molden, P. und Orrenius, S. (1979)  
„Paracetamol metabolism in the Isolated Perfused Rat Liver with Further Metabolism of a Biliary Paracetamol Conjugate by the Small Intestine“  
Biochem. Pharmacol. **28**, 3573-3579.
- Green, R. M. und Elce, J. S. (1975)  
„Acetylation of S -Substituted Cysteines by a Rat Liver and Kidney Microsomal N -Acetyltransferase“  
Biochem. J. **147**, 283-289.
- Green, T. und Odum, J. (1985)  
„Structure/activity studies of the nephrotoxic and mutagenic action of cysteine conjugates of chloro- and fluoroalkenes“  
Chem. Biol. Inter. **54**, 15-31.
- Gros, P., Croop, J. und Housman, D. E. (1986)  
„Mammalian multidrug resistance gene: complete cDNA sequence indicates strong homology to bacterial transport proteins“  
Cell **47**, 371-380.
- Guengerich, F. P., Crawford, W. M. J., Domaraddzki, J. Y., MacDonald, T. L. und Watanabe, P. G. (1980)  
„In vitro activation of 1,2-dichlorethane by microsomal and cytosolic enzymes“  
Toxicol. Appl. Pharmacol. **55**, 303-317.
- Habig, W. H., Pabst, M. J. und Jakoby, W. B. (1974)  
„Glutathione S -Transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation“  
J. Biol. Chem. **249**, 7130-7139.

- Hanahan, D. (1985)  
„Techniques for transformation of *E. coli*“ in: DNA cloning. A practical approach (Glover, D. M., ed.), Vol. 1, pp. 109-135  
IRL Press Oxford.
- Hanigan, M. H., Gallagher, B. C., Taylor, P. T. Jr. und Large, M. K. (1994)  
„Inhibition of  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase activity by acticin *in vivo* protects the kidney from cisplatin-induced toxicity“  
Cancer Res. **54** (22), 5925-5929.
- Harlowe, E. und Lane, D. (1988)  
„Antibodies. A Laboratory Manual“  
Cold Spring Harbor, New York.
- Harris, E. L. V. und Angal, S. (1986)  
„Protein Purification Applications: A Practical Approach“  
IRL Press, Oxford.
- Heim, M. H., Blum, M., Beer, M. und Meyer, U. A. (1991)  
„Acetylation of Serotonin in the Rabbit Pineal Gland: An *N*-Acetyltransferase with Properties Distinct from NAT1 and NAT2 is Responsible“  
J. Neurochem. **57**, 1095-1099.
- Hjelmeland, L. M., Klee, W. A. und Osborne Jr., J. C. (1983)  
„A New Class of Nonionic Detergents with a Gluconamide Polar Group“  
Anal. Biochem. **130**, 485-490.
- Hla, T. und Maciag, T. (1990)  
„An abundant transcript induced in the differentiating human endothelial cells encodes a polypeptide with the structural similarities to G-protein-coupled receptors“  
J. Biol. Chem. **265**, 9308-9313.
- Holmes, D. S. und Qigley, M. (1981)  
„A rapid boiling method for preparation of bacterial plasmids“  
Anal. Biochem. **114**, 193-197.
- Hughey, R. P., Rankin, B. B., Elce, J. S. und Curthoys, N. P. (1978)  
„Specificity of a Particulate Rat Renal Peptidase and its Localization Along with Other Enzymes of Mercapturic Acid Synthesis“  
Arch. Biochem. Biophys. **186** (2), 211-217.
- Ilett, K. F., Reeves, P. T., Minchin, R. F., Kinnear, B. F., Watson, H. F. und Kadlubar, F. F. (1991)  
„Distribution of acetyltransferase activities in the intestines of rapid and slow acetylators rabbits“  
Carcinogenesis **12** (8), 1465-1469.
- Inoue, M., Okajima, K. und Morino, Y. (1981)  
„Renal transtubular transport of mercapturic acids *in vivo*“  
Biochem. Biophys. Acta **641**, 122-128.

- Inoue, M., Okajima, K. und Morino, Y. (1982)  
„Metabolic cooperation of liver and kidney in mercapturic acid biosynthesis in vivo“  
*Hepatology* **2**, 311-316.
- Inoue, M., Okajima, K. und Morino, Y. (1984)  
„Hepato-Renal Cooperation in Biotransformation, Membrane Transport and Elimination of Cysteine S-conjugates of Xenobiotics“  
*J. Biochem. (Tokyo)* **95**, 247-254.
- Inoue, M., Okajima, K., Nagase, S. und Morino, Y. (1987)  
„Inter-Organ Metabolism and Transport of a Cysteine-S-conjugate of Xenobiotics in Normal and Mutant Analbuminemic Rats“  
*Biochem. Pharmacol.* **36** (13), 2145-2150.
- Ishikawa, T. (1992)  
„The ATP-dependent glutathion-S-conjugate export pump“  
*TIBS* **17**, 463-468.
- Ishmael, J., Pratt, I. und Lock, E. A. (1982)  
„Necrosis of the pars recta (S3 segment) of the rat kidney produced by hexachloro-1:3-butadiene“  
*J. Pathol.* **138**, 99-113.
- Jäger, M. (1993)  
„Präparative Teilreinigung einer *N*-Acetyl-S-Transferase aus Schweineniere und die Bestimmung ihrer kinetischen Daten“  
Diplomarbeit, TH Darmstadt.
- Jakoby, W. B. und Habig, W. H. (1980)  
„Glutathione transferases“ in: *Enzymatic Basis of Detoxification*  
(Jakoby, W. B., ed.), Vol. 2, p. 63  
Academic Press, New York.
- Jakoby, W. B., Stevens, J. L., Duffel, M. und Weisiger, R. A. (1984)  
„The mercapturic acid shunt: the terminal enzymes“  
*Rev. Biochem. Toxicol.* **6**, 97-116.
- Juliano, R. L. und Ling, V. (1976)  
„A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants“  
*Biochem. Biophys. Acta* **455**, 152-162.
- Keen, J. H. und Jakoby, W. B. (1978)  
„Glutathione transferases. Catalysis of nucleophilic reactions with glutathione“  
*J. Biol. Chem.* **253**, 5654-5657.
- Kelly, S. L. und Sim, E. (1994)  
„Arylamine *N*-acetyltransferase in Balb/c mice: identification of a novel mouse isoenzyme by cloning and expression *in vitro*“  
*Biochem. J.* **302**, 347-353.

Khyse-Andersen, J. (1984)

„Electroblotting of multiple gels: A simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose“

J. Biochem. Biophys. Methods **10**, 203-209.

Kim, H., Kim, S. G., Lee, M.-Y. und Novak, R. F. (1992)

„Evidence for elevation of cytochrome P4502E1 (alcohol-inducible form) mRNA levels in rat kidney following pyridine administration“

Biochem. Biophys. Res. Commun. **186**, 846-853.

Kozak, E. M. und Tate, S. S. (1982)

„Glutathione-degrading enzymes of microvillus membranes“

J. Biol. Chem. **257**, 6322-6327.

Lambert, N. (1991)

„Protein purification methods - a practical approach“

IRL Press, Oxford

Lash, L. H. und Anders, M. W. (1988)

„Glutathione Homeostasis and Glutathione S -Conjugate Toxicity in the Kidney“

Rev. Biochem. Toxicol. **9**, 29-67.

Layne, E. (1957)

„Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins“

Methods Enzymol. **3**, 269-273.

Lewis, K. (1994)

„Multidrug resistance pumps in bacteria: variations on a theme“

TIBS **19**, 119-123.

Lock, E. A. (1988)

„Studies on the mechanism of nephrotoxicity and nephrocarcinogenicity of halogenated alkenes“

CRC Crit. Rev. Tox. **19**, 23-42.

Lock, E. A. (1989)

„Mechanism of nephrotoxic action due to organohalogenated compounds“

Toxicol. Letters **46**, 93-106.

Lock, E. A. und Ishmael, J. (1984)

„The effect of the organic anion transport inhibitor probenecid on renal cortical uptake and proximal tubular toxicity of hexachloro-1,2-butadiene“

Toxicol. Appl. Pharmacol. **73**, 124-137.

Lock, E. A., Odum, J. und Ormond, P. (1986)

„Transport of *N*-acetyl-S -pentachloro-1,3-butadienylcysteine by rat renal cortex“

Arch. Toxicol. **59**, 12-15.

- Makita, K., Falck, J. R. und Capdevila, J. H. (1996)  
„Cytochrome P450, the arachidonic acid cascade and hypertension: new vistas for an old enzyme system“  
FASEB J. **10**, 1456-1463.
- Makita, K., Takahashi, K., Karara, A., Jacobson, H. R., Falck, J. R. und Capdevila, J. H. (1994)  
„Experimental and/or genetically controlled alterations of the renal microsomal cytochrome P-450 epoxigenase induce hypertension in rats fed a high salt diet“  
J. Clin. Invest. **94**, 2414-2420.
- Matsudaira, P. (1987)  
„Sequence from Picomole Quantities of Proteins Electroblotted onto Polyvinylidene Difluoride Membranes“  
J. Biol. Chem. **262**, 10035-10038.
- Mattano, S. S., Land, S., King, C. M. und Weber, W. W. (1989)  
„Purification and Biochemical Characterization of Hepatic Arylamine *N*-Acetyltransferase from Rapid and Slow Acetylators Mice: Identity with Arylhydroxamic Acid *N,O*-Acyltransferase and *N*-Hydroxyarylamine *O*-Acetyltransferase“  
Mol. Pharmacol. **35**, 599-609.
- Meister, A. (1973)  
„On the Enzymology of Amino Acid Transport“  
Science **180**, 33-39.
- Meister, A. und Tate, S. S. (1976)  
„Glutathione and Related  $\gamma$ -Glutamyl Compounds. Biosynthesis and Utilization“  
Annu. Rev. Biochem. **45**, 559-604.
- Minn, A., Gherzi-Egea, J.-F., Perrin, R., Leininger, B. und Siest, G. (1991)  
„Drug metabolizing enzymes in the brain and cerebral microvessels“  
Brain Res. Rev. **16**, 65-82.
- Moldeus, P. K., Jones, D. P., Ormstad, L. und Orrenius, S. (1978)  
„Formation and metabolism of a glutathione-S-conjugate in isolated rat liver and kidney cells“  
Biochem. Biophys. Res. Commun. **83**, 195-200.
- Monks, T. J., Anders, M. W., Dekant, W., Stevens, J. L., Lau, S. S. und Bladeren, P. J. (1990)  
„Glutathione conjugate mediated toxicities“  
Toxicol. Appl. Pharmacol. **106**, 1-19.
- Nakamura, M., Imaoka, S., Miura, K., Tanaka, E., Misawa, S. und Funae, K. (1994)  
„Induction of cytochrome P450 isozymes in rat renal microsomes by cyclosporin A“  
Biochem. Pharmacol. **48**, 1743-1746.

- Nelson, D. R., Kamataki, T., Waxman, D. J., Guengerich, F. P., Estabrook, R. W., Feyereisen, R., Gonzalez, F. J., Coon, M. J., Gunsalus, I. C., Gotoh, O., Okuda, K. und Nebert, D. W. (1993)  
„The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature“  
DNA Cell Biol. **12**, 1-51.
- Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D. und Erhardt, W. (1988)  
„Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250“  
Electrophoresis **9**, 255-262.
- Neville, D. M. (1971)  
„Molecular Weight Determination of Protein-Dodecyl Sulfate Complexes by Gel Electrophoresis in a Discontinuous Buffer System“  
J. Biol. Chem. **246**, 6328-6334.
- Oesch, F. und Wolf, C. R. (1989)  
„Properties of the microsomal and cytosolic glutathione transferases involved in hexachloro-1:3-butadiene conjugation“  
Biochem. Pharmacol. **38**, 353-359.
- Okajima, K., Inoue, M., Morino, Y. und Itoh, K. (1984)  
„Topological aspects of microsomal *N*-acetyltransferase, an enzyme responsible for the acetylation of cysteine *S*-conjugates of xenobiotics“  
Eur. J. Biochem. **142**, 281-286.
- Orlowski, M. und Meister, A. (1970)  
„The  $\gamma$ -Glytanyl-Cycle: A Possible Transport System for Amino Acids“  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **67**, 1248-1255.
- Orrenius, S., Ormstad, K., Thor, H. und Jewell, S. (1983)  
„Turnover and functions of glutathione studied with isolated hepatic and renal cells“  
Fed. Proc. **42**, 3177-3188.
- Pasternack, R. (1994)  
„Die mikrosomale *N*-Acetyltransferase aus Schweinenieren: Verbesserte Reinigungsstrategie und proteinchemische Untersuchungen“  
Diplomarbeit, TH Darmstadt.
- Pearson, C. K. und Cunningham, C. (1993)  
„Multidrug resistance during cancer chemotherapy - biotechnological solutions to a clinical problem“  
TIBTECH **11**, 511-516.
- Peterson, L. A., Harris, T. M. und Guengerich, F. P. (1988)  
„Evidence for an episulfonium ion intermediate in the formation of *S*-[2-(*N*7-guanyl)ethyl]glutathione in DNA“  
J. Am. Chem. Soc. **110**, 3284-3291.

Peterson, G. L. (1983)

„Determination of total protein“  
Methods Enzymol. **91**, 95-119.

Potter, C. L., Gandolfi, A. J., Nagle, R. und Clayton, J. W. (1981)

„Effects of inhaled chlorotrifluoroethylene and hexafluoropropene on the rat kidney“  
Toxicol. Appl. Pharmacol. **59**, 431-440.

Reichert, D., Ewald, D. und Henschler, D. (1975)

„Generation and inhalation toxicity of dichloroacetylene“  
Food Cosmet. Toxicol. **13**, 511-515.

Richardson, K. A., Edwards, V. T., Jones, B. C. und Hutson, D. H. (1991)

„Metabolism in the rat of a model xenobiotic plant metabolite  
S -benzyl-N -malonyl-L-cysteine“  
Xenobiotica **21** (3), 371-382.

Saito, K., Shinohara, A., Kamataki, T. und Kato, R. (1986)

„N -Hydroxyarylamine O -Acetyltransferase in Hamster Liver: Identity with  
Arylhydroxamic Acid N,O -Acetyltransferase and Arylamine N -Acetyltransferase“  
J. Biochem. (Tokyo) **99**, 1689-1697.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989)

„Molecular cloning: a laboratory manual“  
Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.

Sandermann, H. (1992)

„Plant metabolism of Xenobiotics“  
TIBS **17**, 82-84.

Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977)

„DNA sequencing with chain-terminating inhibitors“  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**, 5463-5467.

Schaeffer, V. H. und Stevens, J. L. (1987)

„Mechanism of Transport for Toxic Cysteine Conjugates in Rat Kidney Cortex  
Membrane Vesicles“  
Mol. Pharmacol. **32**, 293-298.

Schrenk, D., Dekant, W. und Henschler, D. (1988)

„Metabolism and Excretion of S -Conjugates Derived from Hexachlorobutadiene in the  
Isolated Perfused Rat Kidney“  
Mol. Pharmacol. **34**, 407-412.

Spencer, H. C., Rowe, V. E., Adams, E. M., McCollister, D. D. und Irish, D. D.  
(1951)

„Vapor toxicity of ethylene dichloride determined by experiments on laboratory animals“  
Arch. Ind. Hyg. Occup. Med. **4**, 482-493.



Stevens, J. und Jakoby, W. B. (1983)

„Cysteine Conjugate  $\beta$ -Lyase“  
Mol. Pharmacol. **23**, 761-765.

Sugawara, I., Kataoka, I., Morishita, Y., Hamada, H., Tsuruo, T., Itoyama, S. und Mori, S. (1988)

„Tissue distribution of P-glycoprotein encoded by a multidrug-resistant gene as revealed by a monoclonal antibody, MRK 16“  
Cancer Res. **48**, 1926-1929.

Suzuki, S. und Tateishi, M. (1981)

„Purification and characterization of a rat liver enzyme catalyzing *N*-deacetylation of mercapturic acid conjugates“  
Drug Metab. Dispos. **9**, 573-577.

Tate, S. S. und Meister, A. (1974)

„Interaction of  $\gamma$ -Glutamyl Transpeptidase with Amino Acids, Dipeptides and Derivates and Analogs of Glutathione“  
J. Biol. Chem. **249**, 7593-7602.

Tateishi, M., Suzuki, S. und Shimizu, H. (1978)

„Cysteine conjugate  $\beta$ -lyase in rat liver: a novel enzyme catalyzing formation of thiol-containing metabolites of drugs“  
J. Biol. Chem. **253**, 8854-8859.

Thiebaut, F., Tsuruo, T., Hamada, H., Gottesman, M. M., Pastan, I. und Willingham, M. C. (1987)

„Cellular localization of the multidrug-resistant gene product P-glycoprotein in normal human tissues“  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**, 7735-7738.

Vamvakas, S., Berthold, K., Dekant, W. und Henschler, D. (1988a)

„Bacterial cysteine conjugate  $\beta$ -lyase and the metabolism of cysteine *S*-conjugates: Structural requirements for the cleavage of *S*-conjugates and the formation of reactive intermediates“  
Chem. Biol. Inter. **65**, 59-71.

Vamvakas, S., Elfarra, A. A., Dekant, W., Henschler, D. und Anders, M. W. (1988b)

„Mutagenicity of amino acid and glutathione *S*-conjugates in the Ames test“  
Mut. Res. **206**, 83-90.

Vamvakas, S., Köchling, A., Berthold, K. und Dekant, W. (1989)

„Cytotoxicity of cysteine *S*-conjugates: structure-activity relationships“  
Chem. Biol. Inter. **71**, 79-90.

Van Bladeren, P. J., Gen, A., Breimer, D. D. und Mohn, G. R. (1979)

„Stereoselective activation of vicinal dihalogen compounds to mutagens by glutathione conjugation“  
Biochem. Pharmacol. **28**, 2521-2524.

- du Vingeaud, V. und Meyer, C. E. (1932)  
„The racemization of amino acids in aqueous solution by acetic anhydride“  
J. Biol. Chem. **98**, 295-308.
- Vuillard, L., Braun-Breton, C. und Rabilloud, T. (1995)  
„Non-detergent sulfobetains: A new class of mild solubilization agents for protein purification“  
Electrophoresis **305**, 337-343.
- Wahlländer, A. und Sies, H. (1979)  
„Glutathione S -conjugate formation from 1-chloro-2,4-dinitrobenzene and biliary S -conjugate excretion in the perfused liver“  
Eur. J. Biochem. **96**, 441-446.
- Wallin, A., Gerdes, R. G., Morgenstern, R., Jones, T. W. und Ormstad, K. (1988)  
„Features of microsomal and cytosolic glutathione conjugation of hexachlorobutadiene in rat liver“  
Chem. Biol. Inter. **68**, 1-11.
- Weisiger, R. A. und Jakoby, W. B. (1979)  
„Thiol S -methyltransferase from rat kidney microsomes“  
Arch. Biochem. Biophys. **196**, 631-649.
- Weissburger, E. K. (1977)  
„Carcinogenicity studies on halogenated hydrocarbons“  
Environ. Health Persp. **21**, 7-16.
- Wild, D., Feser, W., Michel, S., Lord, H. L. und Josephy, P. D. (1995)  
„Metabolic activation of heterocyclic aromatic amines catalyzed by human arylamine N -acetyltransferase isozymes (NAT1 and NAT2) expressed in *Salmonella typhimurium*“  
Carcinogenesis **16**, 643-648.
- Wolf, C. R., Berry, P. N., Nash, J. A., Green, T. und Lock, E. A. (1984)  
„Role of microsomal and cytosolic glutathione S -transferases in the conjugation of hexachloro-1:3-butadiene and its possible relevance to toxicity“  
J. Pharmacol. Exp. Ther. **228**, 202-208.
- Zanelli, U., Puccini, P., Acerbi, D., Ventura, P. und Gervasi, P. G. (1996)  
„Induction of peroxisomal  $\beta$ -oxidation and P-450 4A-dependent activities by pivalic and trichloroacetic acid in rat liver and kidney“  
Arch. Toxicol. **70**, 145-149.
- Zangar, R. C., Woodcroft, K. J. und Novak, R. F. (1996)  
Differential effects of ciprofibrate on renal and hepatic cytochrome P450 2E1 expression“  
Toxicol. Appl. Pharmacol. **141**, 110-116.

### **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, daß ich meine Dissertation selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Darmstadt, November 1999

(Torsten Kraus)